

UNIVERSITÉ DE PARIS

Anné 1964

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U – N° 400

T H E S E

présentée :

**A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS**

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

par
Mikhaïl MOURAD

Soutenue le 22 Juin 1964

**ÉTUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES DE DETERMINATION DU
FIBRINOGENE DU PLASMINOGENE ET DE LA FIBRINOLYSE.**

JURY MM. J. E. COURTOIS, Président

M. PIETTE

F. PERCHERON

} **Examineurs**



UNIVERSITÉ DE PARIS

année 1964

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U – N° 400

T H E S E

présentée :

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

par

Mikhaïl MOURAD

Soutenue le 22 Juin 1964

ÉTUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES DE DETERMINATION DU
FIBRINOGENE DU PLASMINOGENE ET DE LA FIBRINOLYSE.

JURY MM. J. E. COURTOIS, Président

M. PIETTE

F. PERCHERON

} Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

- MM. G. VALETTE, O , C , Doyen.
M. M. JANOT, O , C , Assesseur,
P. MALANGEAU, O , Assesseur.
L. RODINEAU, , O , Secrétaire général.
L. JEANDEL, O , Secrétaire général adjoint.
L. JEANDEL, O , Secrétaire général adjoint.
Mme S. CERTAIN, O , Secrétaire.
M. L. ESPINASSE, O , Secrétaire.
G. FROISSART, , Secrétaire.

DOYEN HONORAIRE

- M. R. FABRE, C , C ,
Membre de l'Institut.

PROFESSEURS HONORAIRES

- MM. M. DELÉPINE, C , C , Membre de l'Institut.
L. LAUNOY, O , O 
P. FLEURY, O , O 
M. MASCRÉ, O , C 
M. PICON, O , O 
C. BEDEL, , O 
R. FABRE, C , C ,
Membre de l'Institut.

PROFESSEURS

- | | | | |
|------|---|-------|--|
| MM. | M. M. JANOT, O  , C  | | Parmacie galénique (T.). |
| | G. VALETTE, O  , C  | | Pharmacodynamie (T.). |
| | R. PARIS,  , O  | | Histoire naturelle des médicaments
simples d'origine végétale (T.). |
| | M. GUILLOT,  , O  | | Physique (T.). |
| | J. GAUTIER,  , O  | | Chimie organique (T.). |
| Mlle | S. LAMBIN,  , O  | | Microbiologie (T.). |
| MM. | Y. RAOUL,  , O  | | Physiologie (T.). |
| | J. COURTOIS,  , O  | | Chimie biologique (T.). |
| | L. DOMANGE,  , O  | | Chimie minérale (T.). |
| | P. CRÉTÉ,  , O  | | Botanique (T.). |
| | R. TRUHAUT, O  , O  | | Toxicologie et Hygiène industrielle
(T.). |
| | A. MORETTE,  , O  | | Hydrologie (T.). |
| | R. CAVIER, O  | | Parasitologie (T.). |
| | A. QUEVAUVILLER, O  | | Hygiène et Éducation sanitaire (T.). |
| | R. MOREAU,  , O  | | Pharmacie chimique (T.). |
| | J. GUY, O  | | Mathématiques appliquées aux
sciences physiques et biologiques
(T.P.). |
| | A. GERMAN, O  | | Virologie et Sérologie (T.P.). |
| | M. PIETTE,  , O  | | Biologie sanguine (T.P.). |
| | P. MALANGEAU, O  | | Chimie analytique (T.). |
| | M. GIRARD, O  | | Chimie appliquée à l'expertise (T.). |
| | G. DILLEMANN, | | Législation, Déontologie et Histoire
de la Pharmacie (T.). |
| | J. FLAHAUT,  | | Minéralogie (T.P.). |
| | G. DEYSSON, O  | | Cytologie végétale (T.P.). |

PROFESSEURS

MM.	C. BOUDÈNE.....	Toxicologie et Hygiène industrielle (T.P.).
	A. LE HIR.....	Pharmacie galénique (S.C.).
	J. RENAULT, O.....	Chimie organique (S.C.).
	P. DELAVEAU.....	Matière médicale (S.C.).
	P. LARUELLÉ.....	Physique (S.C.).
	A. MANGEOT.....	Pharmacie galénique industrielle (S.C.).
	P. ROSSIGNOL.....	Pharmacodynamie.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	Y. COHEN.....	Sciences naturelles.
	G. LE MOAN.....	Toxicologie.
	H. RENAULT, O.....	Pharmacie chimique.
	C. PAOLETTI.....	Sciences appliquées.
	P. REYNAUD.....	Sciences physico-chimiques.
	J. POISSON.....	Sciences naturelles.
	A. DESVIGNES, O.....	Microbiologie.
	F. PERCHERON.....	Biochimie.
	J. SAVEL.....	Sciences naturelles.
	J. BORY.....	Sciences naturelles.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET.....	Parasitologie.
	A. CAVE (F.F.).....	Pharmacie chimique et galénique.
	P. CORRIEZ, O.....	Physique.
	C. DREUX.....	Électrochimie appliquée à l'analyse.
	P. GESTEAU, O.....	Physique biologique.
	J. GOUNELLE.....	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Biologie).
	H. GUÉRIN, O.....	Micrographie (3 ^e année), essais des drogues végétales.
	J. HARISPE, O.....	Chimie générale et pharmaceutique.
	J. HENRY.....	Chimie (4 ^e année).
Mme	J. HUBERT.....	Microbiologie.
MM.	R. LELUC.....	Microbiologie.
	M. LEMONNIER.....	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
Mme	S. LEMONTEY.....	Chimie (4 ^e année).
Mlle	S. LONGUEVALLE, O.....	Service des examens de Chimie.
Mlle	H. MORIN.....	Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments.
MM.	F. PELLERIN.....	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
	R. PERLES.....	Chimie biologique.
	J. PESTIS (F.F.).....	Biologie animale.
	R. POUILLAIN.....	Hématologie.
Mme	M. ROBERT.....	Sérologie.
Mlle	A. ROLLEN, O.....	Biologie végétale.
Mlle	L. SEGUIN (F.F.), O.....	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Physico-chimie).
Mme	SEILLER (F.F.).....	Pharmacie galénique industrielle.
M.	J. YONGER (F.F.).....	Chimie analytique (1 ^{re} année).

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	J. MANDEREAU.....	Chef de travaux pratiques de Pharmacotechnie galénique.
----	-------------------	---

BIBLIOTHÈQUE

Mlle	Y. RUYSSSEN, O.....	Conservateur, chargé de la Direction.
Mlle	S. LAVAUD, O.....	Conservateur.
Mme	G. KREHMER, O.....	Conservateur.
Mme	A. DESGRIPPES, O.....	Bibliothécaire.

A mon Père

A ma Mère

envers qui ma gratitude est infinie

A mes Frères

A mes Sœurs

A ma Famille

en témoignage de vive affection.

A Monsieur le Professeur J. E. COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie.

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui nous a accueilli en France et accepté dans son
Laboratoire, nous a donné le sujet de cette thèse et nous a
confié les fonctions d'assistant auxiliaire dans son service.

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Maurice PIETTE

Professeur à titre personnel de Biologie sanguine à la Faculté
de Pharmacie,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui a bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

En témoignage de sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur François PERCHERON

Maître de Conférence de Chimie Biologique à la Faculté
de Pharmacie,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

qui nous a encouragé par des conseils toujours stimulants
et a bien voulu accepter de juger notre travail.

En témoignage de vive gratitude.

A Monsieur Léon MANET

Assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Pharmacien Chef de l'Hôpital Intercommunal
d'AULNAY-SOUS-BOIS

qui nous a constamment guidé dans nos travaux et
vous a fait bénéficier de son expérience scientifique.

En témoignage de notre particulière reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Maurice GARNIER

Professeur à la Faculté Française de Médecine et de Pharmacie
de BEYROUTH (LIBAN)

Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui fut notre Maître à l'Internat de l'Association
Hospitalière Française au Liban.

En témoignage de notre respectueux attachement.

Nos sincères remerciements vont à MM.

M. SAMAMA Chef de Laboratoire à
l'Hôpital BROUSSAIS

E. VAIREL Directeur Scientifique aux Laboratoires CHOAY

et R. PERLÈS, Chef de Travaux à la Faculté de
Pharmacie de PARIS

qui par leurs bienveillants conseils nous ont aidé à
effectuer ce travail.

INTRODUCTION

L'étude biochimique de la fibrinolyse présente un gros intérêt dans certains syndromes hémorragiques: Il nous a semblé indispensable de préciser les techniques utilisées et d'étudier la signification des résultats obtenus :

Parmi les cas très divers (médicaux, obstétricaux, chirurgicaux) où les fibrinolyse peuvent s'observer, certains se produisent chez des malades soumis à un traitement héparinique intense (chirurgie avec circulation extra-corporelle). Il nous a donc paru utile de mettre au point des méthodes de dosage du fibrinogène pouvant être utilisées sans qu'une héparinémie thérapeutique intense gêne le dosage. Ces techniques permettent aussi d'utiliser les prélèvements sur hérapine destinés à d'autres déterminations biologiques. Les résultats devant être fournis très rapidement pour pouvoir combattre des fibrinolyse aiguës, mais nous nous sommes attaché, en particulier à l'étude de la technique très rapide de VON CLAUSS encore peu connue.

Nous avons ensuite étudié les conditions opératoires précises permettant l'étude de l'autre facteur de base intervenant dans la fibrinolyse : la plasminogène. Nous avons donc adapté une technique actuellement considérée comme la plus précise.

Nous avons été amenés à étudier et critiquer la signification exacte de cette technique. Puis nous avons étudié la technique de mesure de l'activité fibrinolytique globale du plasma suivant la méthode des plateaux de fibrine d'ASTRUP, étendue par différents auteurs à l'estimation des divers facteurs intervenant dans le mécanisme de la fibrinolyse. Nos essais nous ont ici encore conduit à discuter la signification exacte de cette technique.

Etant donné la complexité du mécanisme de la fibrinolyse et de l'état encore incertain de nos connaissances sur les activateurs et les inhibiteurs qui entrent en jeu aux différents stades, nos résultats ne peuvent souvent pas être interprétés de façon certaine et nous sommes obligés de présenter plusieurs de nos conclusions comme de simples hypothèses.

Nous avons enfin appliqué les techniques que nous avons mises au point à l'étude de différents états physiologiques et pathologiques.



FIBRINOGENE

BIBLIOGRAPHIE

Origine et Localisation

Le fibrinogène est élaboré principalement au niveau de la cellule hépatique par une fonction de synthèse différente de la fonction prothrombinogénétique.

La moelle osseuse participe aussi dans une certaine mesure à sa synthèse.

Il existe dans le hyalomère des plaquettes et forme un élément constitutif du ciment interstitiel des tissus de soutien, des endothéliums vasculaires en particulier. Il est présent en outre dans la lymphe, divers exsudats et transudats tels que le liquide pleural et le liquide d'ascite.

Propriétés Physico-chimiques

Le fibrinogène constitue une des molécules les moins solubles et les plus instables du système protéique plasmatique.

Sa concentration dans le plasma humain est de l'ordre de 3 à 5 grammes par litre.

Les techniques physiques : viscosité, diffusion de la lumière, ultracentrifugation s'accordent à lui donner un poids moléculaire de $340.000 + 10.000$ constitué de 2 subunités d'environ 170.000 (26,99).

La forme de sa molécule est cylindrique et très allongée, cette structure est l'un des facteurs qui expliquerait sa mobilité électrophorétique: sa migration se fait entre bêta 2 et les gamma globulines.

Insoluble dans l'eau, il précipite avec une solution de chlorure de sodium à demi saturation, et de sulfate d'ammonium au quart de saturation (27).

La fraction I de COHN (4) (précipité obtenu avec une concentration de 8 % en éthanol, à 0°C, à pH = 7,2 et en milieu de force ionique = 0,14) contient 60 à 70 en poids de fibrinogène, le

reste étant formé principalement par le facteur antihémophilique A, une profibrinolysine et une cryoglobuline physiologique.

Le fibrinogène représente aussi le constituant essentiel de la fraction F de KEKWICK (4) précipité obtenu avec une concentration d'éther de 11 % à 0°C, à pH = 7,8 et en milieu de force ionique = 0,14).

Si la précipitation du fibrinogène paraît très aisée, sa purification reste un problème difficile, d'une part à cause de l'instabilité de ses solutions et du fait que d'autre part lors de la préparation, d'autres facteurs de la coagulation s'absorbent sur lui comme la globuline antihémophilique A, le plasminogène et la F. S. F. — facteur de stabilisation de la Fibrine (25) —.

Plusieurs procédés de purification sont utilisés : dialyses répétées (56), reprécipitation par l'éther (KEKWICK 47), reprécipitation alcoolique en présence de glycine (21, 22); absorption préalable de la globuline antihémophilique et du plasminogène. (16).



CONSTITUTION

D'après les valeurs établies par TRISTRAM (104) la composition en acides aminés du fibrinogène est caractérisée par la richesse en acides glutamique et aspartique, lysine, arginine et sérine.

Composition en acides aminés (en grammes pour 100) du Fibrinogène

Clycine	5,6	Gystéine	0,4	Proline	5,7
Alanine	3,7	Cystine	2,3	Ac.aspartique	13,1
Valine	4,1	Méthionine	2,6	Ac.glutamique	14,5
Leucine	7,1	Phénylalanine	4,6	Lysine	9,2
Isoleucine	4,8	Tyrosine	5,5	Arginine	7,8
Sérine	7	Tryptophane	3,3	Histidine	2,6
Thréonine	6,1				

Le fibrinogène constitue un composé intermédiaire entre les holoprotéines et les glycoprotéines. Ces dernières étant les corps libérant par hydrolyse généralement 8 à 20 % d'oses. On admet à la suite de BLIX et arbitrairement que les corps libérant moins de 4 à 5% d'oses sont à classer avec les holoprotéines. Le fibrinogène humain libère par hydrolyse 5% de sucres totaux. Sa composition en sucres a été surtout étudiée par WINZLER (112) qui donne d'après le tableau suivant la teneur du fibrinogène humain en sucres totaux par rapport au fibrinogène bovin.

Composition en oses (g.p. 100) du fibrinogène humain et du fibrinogène bovin.

	<u>Oses Totaux</u>	<u>Fucose</u>	<u>Hexose</u>	<u>Galactose</u>	<u>Hexosa- mines</u>	<u>A. Sia- lique</u>
Fibrinogène humain	5 %	0	3,2 %	1 %	1 %	0,8 %
Fibrinogène bovin	2,3 %	0	1 %	0,5 %	0,7 %	0,6 %

Les groupements alpha aminés terminaux caractérisés sous forme de dinitrophénylaminoacides après combinaison avec le dinitrofluorobenzène selon la méthode de SANGER, indiquent d'après les travaux de BAILEY et de BETTELHEIM (13) que le fibrinogène de bœuf possède deux résidus de Tyrosine, et un résidu d'acide glutamique porteur d'un groupe alpha aminé libre.

La structure du fibrinogène est encore loin d'être déterminée.

Des travaux récents de MESTER (L) et COLL. (76 bis, 77ter), ont permis d'isoler trois glycopeptides A,B,C, contenant 80% des oses du fibrinogène bovin, et de montrer que l'acide sialique est un groupement terminal, que le D — galactose peut être en position terminale ou liée en 1 — 6 (probablement à l'acide sialique), que le D — mannose est lié en 1 — 3, et que la D — glucosamine — N — acétylée est liée en 1 — 3 ou 1 — 4.

La fibrine contient ces quatre oses avec les mêmes liaisons mais en a perdu 20% par rapport au fibrinogène.



CONVERSION FIBRINOGENE — FIBRINE

La propriété la plus importante au point de vue physiologique est sa transformation en une protéine fibreuse : la fibrine.

Cette fibrine a une composition chimique voisine de celle du fibrinogène dont elle dérive et leurs dimensions moléculaires sont comparables.

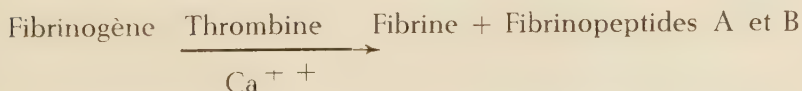
La conversion fibrinogène-fibrine peut se faire artificiellement par des agents chimiques tels que les oxydants: chloramine T, alloxane, ninhydrine, par divers enzymes protéolytiques comme la papaïne.

— ou physiologiquement sous l'action d'un enzyme très spécifique qui est la thrombine ou thrombinase. Cet enzyme dérive d'une alpha 2 globuline la prothrombine ou thrombinogène élaborée aussi par la cellule hépatique mais par une fonction de synthèse différente de celle qui produit le fibrinogène.

La thrombine est capable de transformer in vivo et in vitro 10^5 fois son poids de fibrinogène.

La fibrine formée est une protéine insoluble qui montre au microscope électronique une structure fibrillaire formée de fibrilles striées transversalement et groupées en réseau. Ces fibrilles résultent d'une polymérisation à la fois longitudinale et transversale de monomères de fibrine.

La formation de la fibrine correspond à une action protéolytique partielle et spécifique de la thrombine qui donne naissance aux monomères de fibrine et à deux substances peptidiques résiduelles appelées Fibrinopeptide par LORAND (71), mixture de peptide ou co-fibrine par LAKI (57), ou fibrinopeptides A et B de BAILEY et BETTELHEIM (13) représentant respectivement 80% et 20% du résidu.



Ces peptides contenant surtout de l'arginine apparaissent dans le li-

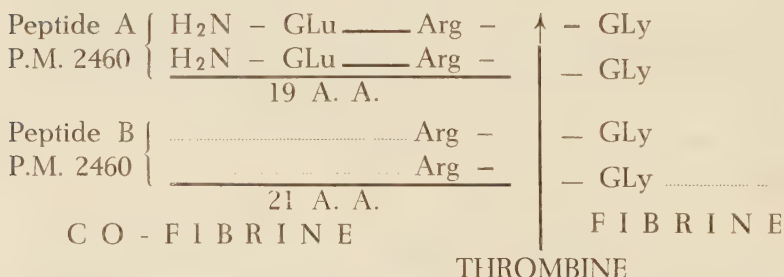
guide surnageant le caillot de fibrine.

Dans la fibrine comme dans le fibrinogène les extrémités à CooH terminal sont les mêmes, et les groupements terminaux sont encore formés de deux molécules de Tyrosine.

Mais, le fait principal dans la conversion du fibrinogène en fibrine, réside dans la disparition de l'acide glutamique du fibrinogène et son remplacement dans la fibrine par de la glycine.

Ce résultat explique la protéolyse partielle du fibrinogène étudiée par BAILEY-BETTELHEIM (13), LORAND (71), MIDDLEBROOK (77), et caractérisée par l'augmentation de l'N non protéique qui atteint 3 à 4% de l'N total à la fin de la conversion.

L'action de la thrombine peut se schématiser de la façon suivante : (90):



Ces deux peptides ont été isolés par BETTELHEIM par électrophorèse sur papier et par chromatographie sur colonne.

- le peptide A (15) contient l'acide glutamique perdu par le fibrinogène lors de la transformation en fibrine.
- le peptide B ne contient pas de résidu N terminal décelable et sa présence explique que le nombre des groupes terminaux de glycine dans la fibrine est plus grand que le nombre de groupes terminaux d'acide glutamique dans le fibrinogène.

Nature de la transformation du fibrinogène en fibrine

Pour de nombreux auteurs l'action de la thrombine sur le fibrinogène était une protéolyse simple décrite autrefois par MEL-LANBY et par NOLF (76).

Pour d'autres comme ASTRUP (6) la thrombine était une fibrino-dénaturase.

Actuellement on considère que la fibrino-formation correspond à une polymérisation de la molécule de fibrinogène après protéolyse partielle (LAKI, MOMMAERTS (58)). Mais les auteurs ne sont pas d'accord sur le mécanisme de cette polymérisation.

Pour LYONS (72) et FERGUSON (37) la coagulation du fibrinogène s'effectue par une réaction périphérique d'oxydo-réduction des terminaisons — s — libres de la molécule du fibrinogène,

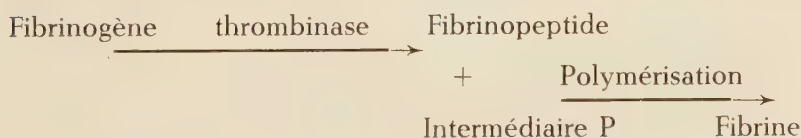
et la thrombine serait formée de deux facteurs A et B ; le facteur A = thrombine proprement dite catalyserait la réduction des terminaisons S du fibrinogène qu'ils appellent «fibrinogène A» en groupements Thiol — SH caractéristiques d'un composé intermédiaire entre le fibrinogène et la fibrine: intermédiaire qu'ils ont appelé «fibrinogène B.»

L'oxydation des groupes SH du fibrinogène B serait catalysée par le facteur B de la thrombine donnant naissance à des liaisons disulfure — S — S-enchaînant de proche en proche les molécules voisines pour former la fibrine.

Ce facteur B ne serait autre que la 2 — méthyl — 1, — 4 naphtoquinone ou vitamine K se comportant comme un effecteur de la fibrino-formation.

Pour SHERRY et TROLL (96) l'action de la thrombase serait à la fois estérasique et peptidasique.

La protéolyse partielle du fibrinogène conduirait à un composé intermédiaire qui se polymérise en fibrine selon le schéma suivant :



Pour LAKI (59) c'est en modifiant la répartition des charges électro-négatives à la surface des molécules de fibrinogène que la thrombine transformerait une répulsion réciproque des molécules en une attraction localisée aux extrémités ou suivant leur grand axe — cette hypothèse a été appuyée par les observations de De

ROBERTIES (34) au microscope électronique.

Actuellement, après les travaux de nombreux auteurs (BAILEY et Collaborateurs, SEEGERs et Collaborateurs, SHERAGA, LO-RAND LAKI) il faut envisager la fibrino-formation en 3 temps (25).

1° — action protéolytique de la thrombine:

Elle agirait très spécifiquement au niveau des liaisons Arginyl — glycine aboutissant à la formation du monomère de fibrine



F = fibrinogène, T = thrombine, P = résidu peptidique,
g = glucide, f = monomère de fibrine, nf = divers monomères.

2° — formation de Polymères intermédiaires :

La polymérisation de ces monomères de fibrine se fait spontanément par liaisons hydrogène et forces électrostatiques:



f^n = polymères intermédiaires

les deux premières étapes sont réversibles.

3° — coagulation proprement dite :

Les polymères intermédiaires s'organisent de façon irréversible en un réseau de fibrine stable.

Ce schéma reste cependant sujet à discussion et le mécanisme de polymérisation dépend de plusieurs facteurs :

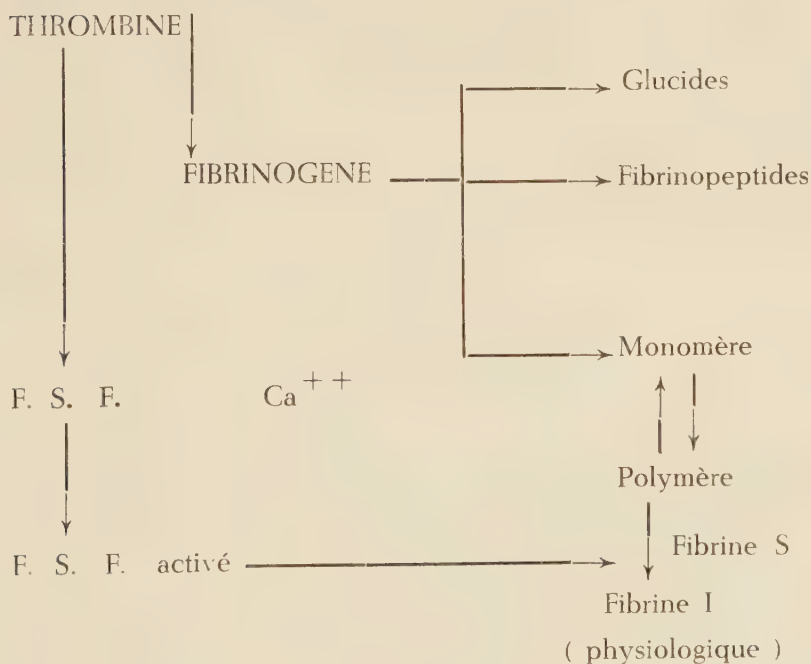
Selon que l'on fait agir la thrombine sur un fibrinogène purifié en solution aqueuse ou sur un fibrinogène plasmatique on obtient une fibrine « S » soluble (60) dans des solutions d'urée 5M ou insoluble : fibrine « I » (68).

Cette différence de solubilité dépend d'un facteur plasmatique et sérique de stabilisation de la fibrine associée à du calcium ionisé. Ce facteur est appelé F. S. F. (fibrin — Stabilizing factor, ou fibrinase de LOEWY (69)) .

Il est non dialysable et constitue le facteur LL de LAKI-LORAND (60) retrouvé dans la fraction V de COHN et P de KEKWICK.

Il est à noter aussi l'existence d'un autre facteur plaquettaire jouant le rôle d'accélérateur de la fibrino-formation.

D'une façon succincte le schéma suivant résume les principales étapes de la fibrino-formation:



Cinétique de la réaction fibrinogène-fibrine

La cinétique de la réaction enzymatique étudiée par divers auteurs OWREN (88) MOMMAERTS (79), ASTRUP (7) est variable selon la composition du milieu; à température constante elle obéit à la relation de QUICK (64) :

$$t = \frac{K}{c}$$

t = temps de coagulation

c = concentration en thrombine du milieu

K = constante déterminée par la force ionique du milieu, le pH, et l'intervention des facteurs biologiques activateurs ou inhibiteurs de la thrombine à ce stade, ainsi une augmentation de la teneur en ions des solutions de fibrinogène en particulier en ions Ca^{++} inhibe l'action de la thrombine.

Normalement, la fibrino-formation est très rapide et s'effectue en 10 à 20 secondes.

DETERMINATION DU FIBRINOGENE PLASMATIQUE

De très nombreuses techniques ont été proposées pour la détermination du fibrinogène plasmatique, la plupart sont basées sur la transformation du fibrinogène en fibrine que l'on évalue après isolement par divers procédés.

L'une des plus anciennes méthodes est celle de SASSIER (67) où l'on transforme la fibrinogène en fibrine sous l'action coagulante d'une solution de chlorures de sodium et de calcium. C'est une méthode pondérale donc précise mais nécessitant 5 ml de plasma et d'exécution assez longue. Cette méthode a été reprise et modifiée

par LEROUX, PRUNAUD et FRIGOT (65) qui précipitent le fibrinogène par l'action coagulante spécifique de Thrombine calcique.

D'autres méthodes colorimétriques du Biuret ont été proposées métrique au Biuret. Dans la microméthode de LECLERC et KHODABANDEH (63) le minuscule pâton de fibrine obtenu après action de thrombine est solubilisé dans la soude puis additionné de réactif du Biuret; on effectue la lecture colorimétrique à $540\text{ m}\mu$ et l'on se reporte à la courbe d'étalonnage utilisée pour les protéines sériques.

D'autres méthodes colorimétriques du Biuret ont été proposées pour la détermination du fibrinogène en utilisant comme solution coagulante de la thromboplastine calcifiée (66) ou une solution calcique pour taux de Prothrombine (103) avec lecture photométrique à $530\text{ m}\mu$

ARDRY (5) utilise la méthode colorimétrique au Biuret après avoir précipité le fibrinogène par thermocoagulation à 55°C - 56°C .

Les techniques de précipitation du fibrinogène par les sels sont aussi très nombreuses :

relargage avec les solutions — de sulfite de sodium
— de sulfate d'ammonium
— de sulfate de sodium

MARRENZI et GOMEZ (76) ont proposé comme technique simple de détermination le relargage du fibrinogène par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation, détermination colorimétrique au moyen du Biuret et lecture avec un photomètre Pulfrich.

Récemment D. VINCENT, G. SEGONZAC et R. LACROIX (106) ont proposé une technique opacimétrique avec relargage du fibrinogène au moyen d'une solution aqueuse de sulfate de sodium So^4Na^2 anhydre à 105 grammes pour 1000 ml — et mesure photométrique de l'intensité du trouble produit à $520\text{ m}\mu$. Cette

intensité est reportée sur une courbe étalon construite expérimentalement en opérant sur des solutions de fibrinogène de titres connus, ou des plasmas dont on a déterminé le taux en fibrinogène par la technique pondérale.

Enfin, une microméthode proposée par A. VON CLAUSS (107) étudiée par DESTAING et Collaborateurs (35), consiste à déterminer le temps de coagulation du plasma dilué (concentration faible en fibrinogène) en présence d'une solution concentrée de Thrombine; dans ce cas le temps de coagulation est fonction uniquement du taux de fibrinogène.

C'est une méthode peu sensible mais très rapide et utilisant très peu de plasma.

Rappelons aussi la méthode de dosage du fibrinogène par détermination de l'azote total selon Kjeldahl (89) qui, longue et délicate, est peu utilisée en clinique courante.

CHOIX DE L'ANTICOAGULANT

Toutes ces déterminations doivent évidemment se faire sur plasma et le choix de l'anticoagulant pose un problème.

— L'héparine, inhibiteur de la fibrino-formation allonge le temps de coagulation lors de la transformation du fibrinogène en fibrine et provoque souvent une coagulation partielle.

— Les solutions de citrate diluant le plasma nécessitent une correction de volume tenant compte de l'hématocrite qui permet de rapporter le poids de fibrine au volume réel du plasma. Il faut donc déterminer le rapport du volume anti-coagulant/plasma et cette mesure est peu précise surtout dans le cas de prélèvements de faibles volumes.

— si le sang est recueilli sur mélange de WINTROBE, il faut après la pesée du coagulum séché, calciner le pàton. L'oxalate est transformé en carbonate de calcium ($\text{Co}^3 \text{Ca}$) puis en oxyde de calcium (OCa) qu'il faut peser et on déduit le poids de l'oxalate de calcium retenu par le caillot pour obtenir le poids de fibrine.

— la calcination complète étant difficile et délicate, la précision devient faible.

Pour éviter de tels inconvénients nous avons étudié la possibilité d'effectuer le dosage du fibrinogène dans les prélèvements recueillis sur héparine sèche après sa neutralisation par des anti-héparines: sulfate de protamine, Polybrène, ou bleu de toluidine.

D'autre part, beaucoup de prélèvements sont effectués sur héparine pour d'autres dosages biochimiques et les dosages de fibrinogène sont souvent demandés chez des malades sous traitement héparinique.

Nous avons donc étudié l'influence de l'héparine sur les déterminations de fibrinogène et la possibilité d'effectuer les dosages après **neutralisation** de l'héparine par des substances antagonistes (74).

TECHNIQUES UTILISEES

Nous avons choisi pour cette étude trois techniques et nous avons appliqué les protocoles opératoires proposés par SAMAMA (M.) et MANET (L) dans «**TECHNIQUES d'EXPLORATION DE L'HEMOSTASE ET DE LA COAGULATION** » (93).

— une méthode pondérale dérivée de celles de SASSIER (67) et de LEROUX (65): isolement de la fibrine formée sous l'action de la thrombine puis pesée.

— la microméthode de LECLERC (63) : isolement de la fibrine formée sous l'action de la thrombine, puis dosage par la réaction du biuret.

— la microméthode chronométrique de A. VON CLAUS (35) : Détermination du « Temps de fibrinogène » en présence d'un gros excès de thrombine et d'une concentration faible en fibrinogène (plasma dilué).



MISES AU POINT

Mise en évidence des Perturbations dues à l'Héparine

L'action anti-coagulante de l'héparine n'est pas directe, elle s'effectue par l'intermédiaire d'un co-facteur, d'une co-héparine. Ce système héparine + co-héparine se nomme anti-thrombine immédiate et il est doué de l'activité biologique (64).

En présence de quantités suffisantes d'héparine la coagulation est totalement inhibée, la transformation du fibrinogène en fibrine étant empêchée. En présence de plus faibles doses, la gibrino-formation s'effectue lentement et de manière défectueuse, aboutissant à la formation d'un caillot de mauvaise qualité, formé de mailles tenues faciles à rompre et difficiles à recueillir (COPLEY) (32).

Des plasmas héparinés *in vitro* à des doses de 10 mcg par ml voient leur temps de coagulation en présence de quantités convenables de thromboplastine calcique s'allonger jusque 18 à 24 heures (LARUELLE 61).

Nous avons vérifié dans nos premières expériences la mauvaise fibrinoformation sous l'action de la thrombine dans des plasmas humains recueillis sur héparine.

Des dosages de fibrinogène ont été effectués parallèlement sur un même plasma de cheval recueilli sur héparine (10 mcg par ml), sur mélange de Wintrobe desséché (1 ml pour 10 ml de mélange) et sur solution de citrate (1 ml de solution à 9 g. pour 100 ml de citrate trisodique (cristallisé avec 5,5 OH₂) pour 10 ml de mélange).

Nous avons constaté un allongement du temps nécessaire pour la formation du caillot de fibrine avec le plasma hépariné. Cet allongement très marqué en utilisant la technique pondérale entraîne souvent une coagulation partielle. Il est moins fort mais

net cependant avec les techniques de LECLERC et VON CLAUSS qui utilisent des quantités de thrombine beaucoup plus fortes.

Nous résumons nos constatations dans le tableau suivant :

Prélèvement sur	CITRATE	OXALATE	HEPARINE
Tech. Pondérale C. D. C. C.	2 min. 30 min.	2 min. 30 min.	très tardive partielle au bout de 18 h.
Tech. de LECLERC C. D. C. C.	30 sec. 10 min	30 sec. 10 min	1 min. 15 min.
Technique de VONCLAUSS C.C.	11 sec	11 sec.	18 sec.

C.D. = Coagulation débutante

C.C. = Coagulation complète

Ces valeurs correspondent à des temps moyens que nous avons déterminés à la suite de différents essais. D'un plasma à l'autre des variations assez marquées sont cependant observées.

Étude de l'Influence des Antihéparines sur les

Dosages de Fibrinogène

Acide fort, résultant de la polymérisation d'esters polysulfuriques de la mucoïtine, l'héparine peut être neutralisée par des bases avec lesquelles elle se combine pour former des complexes plus ou moins dissociables inactifs sur la coagulation.

Parmi les anti-héparines, nous avons choisi le sulfate de protamine (=), le bleu de toluidine (= =) et le bromure d'hexadimétrine ou Polybrène (= =)

Ces antihéparines ont eux-mêmes une action sur la coagulation. Mais en se combinant avec l'héparine pour la neutraliser, ils perdent aussi leur propre activité.

Il est donc nécessaire de procéder à l'étude de l'influence de ces antihéparines sur les dosages de fibrinogène par les trois techniques précédemment mentionnées.

Sulfate de Protamine: solution à 1 g. pour 100 ml conservée à + 4° Lot n° 145 préparée à partir de clupéine (Harengs).

Bleu de toluidine, lot dont le rapport pour neutralisation de l'héparine est de : $\frac{8}{1}$ (cf — page solution à 0,5 g.

par 1000 ml de solute physiologique de cl Na à 9 g. par litre.

Polybrène lot n° 1861, solution à 1 g .pour 100 ml. conservée à + 4°.

= Nous remercions les Laboratoires CHOAY qui ont bien voulu aider notre travail et nous ont fourni le produit nécessaire.

= = Nous remercions les Laboratoires ABBOTT qui nous ont fourni les produits nécessaires.

Nous avons effectué plusieurs séries de dosages par les trois méthodes sur plusieurs plasmas recueillis sur citrate après addition de quantités croissantes de chaque antihéparine.

Dans chaque série le même plasma a été utilisé mais ce sont des mélanges différents qui ont été utilisés d'une série à l'autre.

Dans toutes ces séries un dosage sans addition d'antihéparine a été effectué en triple sur le même plasma; le résultat donné correspond à la moyenne de ces trois déterminations.

Dans les tableaux : II, III, IV, nous indiquons comme exemple les résultats obtenus dans l'une de ces séries de déterminations, résultats confirmés par les autres séries.

De plus, nous les avons confirmés par des essais portant uniquement sur les concentrations limites.

Pour uniformiser nos tableaux, nous avons rapporté les quantités d'antihéparine à 1ml de plasma quelle que soit la quantité de plasma utilisée pour les déterminations et nous exprimons les résultats en grammes de fibrinogène par litre de plasma.



TABEAU II — TECHNIQUE PONDERALE

Sulfate de Protamine (mcg/ml de plasma)	0	20	50	100	200	400	500	600	750	1000	2000	3000
Fibrinogène (g/l)	5,2	5,4	5,2	5,2	5,2	5,1	5,3	5,3	5,2	5,8	6	6,2
polybrène (mcg/ml de plasma)	0	1000		4000		8000		20.000		40.000		60.000
Fibrinogène (g/l)	5,5	5,7		5,8		5,6		5,9		5,8		5,5
Bleu de Toluidine (mcg/l de plasma)	0	100		200		300		500		1000		2500
Fibrinogène (g/l)	5,6		5,6	5,6		5,6		5,8		5,4		4,8

TABEAU III — TECHNIQUE DE LECLERC

Sulfate de Protamine mcg/ml de plasma	0	100	200	400	500	600	800	1000	1500	2000	3000
Fibrinogène (g/l)	3	2,8	3,2	3,2	3,2	3	2,9	3	3	3,2	4
Polybrène (mcg/ml de plasma)	0	50	100	200	400	600	800	1000	2000	3000	
Fibrinogène (g/l)	5	5	5,2	4,9	5	5	5,2	5	5	4,3	
Bleu de Toluidine (mcg/ml de plasma)	0	25	37,5	50	75	100	150	200	250		
Fibrinogène (g/l)	2,5	3	3	3,4	3,4	3,6	3,6	3,7	4		

TABLEAU IV - TECHNIQUE A. VON CLAUSS

Sulfate de Protamine (mcg/ml de plasma)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	500	600	800	1000	1800
Fibrinogène (g/l)	4,2	4,5	4,2	4,2	4,7	4,2	4,5	4,3	4,7	4,2	4,5	4,7	4,7	6,6
polybrène (mcg/ml de plasma)	0	25	50	100	150	200	300	400	500	600	800	1000	1800	
Fibrinogène (g/l)	5,2	5,2	5,3	5,3	5,2	5,3	5,1	5,2	5,2	5,5	5,5	5,6	5,6	6,3
Bleu de Toluidine (mcg/l de plasma)	0	50	150	200	400	500	600	800	900	1350				
Fibrinogène (g/l)	5	5	5	5,2	5,3	5	5	5,5	6,3	6,3				

DISCUSSION

I — Sulfate de Protamine

Le sulfate de protamine ne perturbe pas les dosages de fibrinogène jusqu'aux doses suivantes :

- 1.000 mcg par ml de plasma: dans la technique par pesée
- 2.000 mcg par ml de plasma: dans la microtechnique de LECLERC
- 1.000 mcg par ml de plasma : dans la microtechnique de A. VON CLAUSS

Au-delà de ces taux une augmentation a été constatée dans les trois techniques.

II — Polybrène

— Même utilisé à taux élevé dans la technique par pesée, le polybrène ne gêne pas le dosage (jusqu'à 60 mg par ml de plasma).

— Dans la microtechnique de LECLERC, jusqu'à une concentration de l'ordre de 2.000 mcg par ml de plasma les résultats ne sont pas modifiés significativement.

— Dans la microtechnique de A. VON CLAUSS, le polybrène ne provoque pas de perturbation dans le dosage jusqu'à 500 mcg par ml de plasma. Aux concentrations supérieures, il semble causer une légère augmentation des résultats, nette surtout pour plus de 1000 mcg.

III — Bleu de Toluidine

— A partir de 2.000 mcg par ml de plasma une diminution se remarque dans les résultats, pour la technique par pesée.

— Dans la technique de LECLERC, le bleu de Toluidine est

gênant même aux taux les plus faibles, ce qui n'est pas étonnant étant donné que le colorant s'absorbe sur le précipité et gêne donc la colorimétrie.

— Dans la technique de A. VON CLAUSS : jusqu'à 800 mcg par ml de plasma le bleu de toluidine ne gêne pas le dosage. Au-delà de ce taux la formation du caillot devient difficile à saisir. Au contraire, à faible dose la présence d'une coloration dans le milieu facilite la mesure.

ETUDE DE LA NEUTRALISATION DE L'HEPARINE

PAR LES ANTIHEPARINES

Nous avons déterminé les quantités des divers antihéparines suivant des techniques adaptées de celle de BIGGS et MAC FARLANE (17) avec le bleu de toluidine (en utilisant une solution à 0.5 g. pour 1000 ml de soluté physiologique), de WEISS (111) avec la solution commerciale de polybrène (ampoules contenant 0,1 g pour 10 ml), ou de BEAUMONT (14) avec une solution commerciale de sulfate de protamine (flacons contenant 0,1 g pour 10 ml), mais avec des dilutions d'antihéparines appropriées aux quantités d'héparine utilisées pour les prélèvements.

Le rapport des quantités neutralisantes : antihéparine-héparine varie suivant l'origine des produits et suivants les lots de fabrication. Il est donc indispensable de contrôler l'activité des différents lots de produits utilisés (surtout pour le bleu de toluidine dont certains échantillons ont une activité très faible).

Avec les produits que nous avons utilisés, nous avons trouvé les rapports suivants :

$$\frac{\text{Sulfate de protamine}}{\text{héparine}} = \frac{1,5}{1} \quad \text{à} \quad \frac{2}{1}$$

$$\frac{\text{Bleu de toluidine}}{\text{héparine}} = \frac{7}{1} \quad \text{à} \quad \frac{10}{1}$$

$$\frac{\text{Polybrène}}{\text{héparine}} = \frac{1}{1}$$

c'est-à-dire par exemple, que pour neutraliser 1 mcg d'héparine il faut 1,5 à 2 mcg de sulfate de protamine, 7 à 10 mcg de bleu de toluidine et 1 mcg de polybrène.

ETUDE DES DETERMINATIONS DU FIBRINOGENE

SUR PLASMA HEPARINE

EN PRESENCE D'ANTIHEPARINE

Des essais préliminaires ont été effectués avec la technique pondérale sur des plasmas citratés et sur les mêmes plasmas auxquels ont été ajoutés 10 mcg par ml d'héparine et la quantité neutralisante de sulfate de protamine (soit 20 mcg par ml).

Nous avons constaté comme nous le pensions, que les dosages n'étaient pas perturbés : la coagulation se produit normalement et les résultats sont identiques comme le montrent les résultats suivants correspondants à huit dosages effectués sur un plasma citraté

pur: 4,8 — 4,9 — 5 et 4,9 g de fibrinogène par litre et sur le même plasma hépariné et neutralisé 4,9 — 4,9 — 4,8 et 4,9 g de fibrinogène par litre.

Nous avons poursuivi nos recherches en ajoutant in vitro, à des plasmas recueillis sur citrate, des doses croissantes d'héparine que nous avons neutralisées par des doses correspondantes de chacun des antihéparines. Nous avons déterminé avec chacune des trois méthodes de dosage les taux de fibrinogène (exprimés en g. par litre) trouvés pour chaque concentration en héparine neutralisée et nous les avons comparés aux taux trouvés sur les plasmas citratés purs.

Pour uniformiser nos tableaux, nous avons ici encore indiqué les taux d'héparine et d'antihéparine ajoutés en mcg par ml de plasma quelles que soient les prises d'essai utilisées dans chaque méthode de dosage.

Ces déterminations ont été répétées plusieurs fois et nous donnons dans les tableaux V, VI, VII, un exemple d'une série de déterminations (chaque série a été effectuée sur le même plasma mais des plasmas différents ont été utilisés d'une série à l'autre).

DISCUSSION

I — Sulfate de Protamine

L'héparine neutralisée par une quantité adéquate de sulfate de protamine ne perturbe pas les résultats de dosage de fibrinogène jusqu'aux doses suivantes:

- 500 mcg par ml de plasma : dans la technique par pesée.
- 800 mcg par ml de plasma: dans la microtechnique de
LECLERC

- 400 mcg par ml de plasma: dans la microtechnique de VON CLAUS.

II — Polybrène

L'héparine neutralisée par une quantité adéquate de polybrène ne gêne pas les résultats de déterminations de fibrinogène jusqu'aux doses suivantes :

- 800 mcg. par ml de plasma : dans la technique par pesée
- 300 mcg par ml de plasma : dans la microtechnique de LECLERC.
- 1000 mcg par ml de Plasma: dans la microtechnique de VON CLAUS

Dans la microtechnique de LECLERC nous constatons avec le polybrène que les valeurs limites sont plus faibles : Or nous avons observé à partir de ces doses la formation d'un louche dû au complexe héparine-polybrène.

Ce complexe s'adsorbe sur le pâton de fibrine et la solution dans la soude est trouble, ce qui perturbe le dosage colorimétrique.

Nous avons observé aussi un trouble plus faible avec l'héparine et le sulfate de protamine, mais il ne gêne pas le dosage : les solutions ultérieures dans la soude sont limpides et les résultats obtenus ne sont pas modifiés.

III — Bleu de Toluidine

— L'héparine neutralisée par une quantité adéquate de bleu de toluidine ne perturbe pas les résultats de dosage de fibrinogène dans la technique pondérale jusqu'à la dose de 200 mcg par ml de plasma.

— Dans la microtechnique de LECLERC le dosage est perturbé même avec 25 mcg par ml de plasma.

**TABLEAU V – Détermination après addition d'héparine
et de sulfate de protamine**

Technique pondérale	Héparine (mcg/ml)	0	25	50	100	150	200	250	500
	Sulfate de protamine (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400	500	1000
	Fibrinogène (g/l)	5,7	5,7	5,8	5,6	5,6	5,8	6	5,8
Technique de Leclerc	Héparine (mcg/ml)	0	100	200	400	600	800		
	Sulfate de protamine (mcg/ml)	0	200	400	800	1200	1600		
	Fibrinogène (g/l)	4,1	4	3,8	4,3	4,1	3,8		
Technique de VAN CLAUSS	Héparine (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400		
	Sulfate de protamine (mcg/ml)	0	100	200	400	600	800		
	Fibrinogène (g/l)	3,7	3,7	3,7	3,8	3,8	3,7		

**TABLEAU VI – Détermination après addition d'héparine
et de Polybrène**

Technique pondérale	Héparine (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
	Polybrène (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400	500	600	800	1000
	Fibrinogène (g/l)	5,7	5,8	5,7	5,7	5,8	5,9	5,9	6	6	6,5
Technique de Leclerc	Héparine (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400	600	800		
	Polybrène (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400	600	800		
	Fibrinogène (g/l)	6,2	6	6	6,2	7	8,5	7,8	10		
Technique de VON CLAUSS	Héparine (mcg/ml)	0	100	500	600	700	800	1000			
	Polybrène (mcg/ml)	0	100	500	600	700	800	1000			
	Fibrinogène (g/l)	4,1	4	4,2	4	4	4	4	4,2		

**TABLEAU VII – Détermination après addition d'héparine et de
bleu de Toluidine**

Technique pondérale	Héparine (mcg/ml)	0	5	10	20	30	40	50	100	200	300
	Bleu de Toluidine (mcg/ml)	0	50	100	200	300	400	500	1000	2000	3000
	Fibrinogène (g/l)	5,2	5,1	5,3	5,3	5,4	5,2	5,2	5,5	5,6	7,2
Technique de Leclerc	Héparine (mcg/ml)	0	25	50							
	Bleu de Toluidine (mcg/ml)	0	250	500							
	Fibrinogène (g/l)	5,5	7	10							
Technique de VON CLAUSS	Héparine (mcg/ml)	0	100	200	400	500	600				
	Bleu de Toluidine (mcg/ml)	0	1000	2000	4000	5000	6000				
	Fibrinogène (g/l)	5,7	5,7	5,7	5,5	5,5	5,5				

— Dans la microtechnique de A. VON CLAUSS nous remarquons que la combinaison de 5000 mcg par ml de plasma de bleu de toluidine avec 500 mcg d'héparine par ml de plasma ne gêne pas le dosage, alors que cette même dose de bleu de toluidine en l'absence d'héparine perturbe le dosage.

CONCLUSIONS GENERALES

Les dosages de fibrinogène par les trois techniques que nous avons étudiées sont donc possibles sur des plasmas héparinés après neutralisation de cet anti-coagulant par l'une des trois substances neutralisantes ; l'utilisation du bleu de toluidine doit toutefois être rejetée pour les techniques utilisant la réaction du biuret.

Il suffit d'ajouter l'antihéparine à concentration convenable dans les réactifs utilisés pour la transformation du fibrinogène en fibrine.

Ces concentrations correspondent aux taux maximum d'antihéparines choisis d'après les tableaux et pouvant neutraliser le maximum d'héparine sans gêner les déterminations.

Nous proposons d'utiliser systématiquement des concentrations d'antihéparine fortes (à des taux ne perturbant pas les dosages) afin de permettre les déterminations même lorsque la quantité d'héparine utilisée pour le prélèvement est relativement importante. La quantité d'héparine suffisante pour le prélèvement est de 1 mg soit 100 U.I. pour 10 ml de sang total. Les limites possibles de concentration en héparine seront indiquées pour chaque technique.

De plus les taux d'héparinémie au cours des traitements normaux sont en général assez faibles et perturbent peu les méthodes classiques, mais il y a des cas (par exemple, circulation extra-cor-

porelle) où les résultats des dosages de fibrinogène utilisant les techniques classiques sont trop faibles à cause de cette héparinémie thérapeutique. L'utilisation systématique des antihéparines permet d'éviter cet inconvénient.

TECHNIQUES PROPOSEES

Nous proposons donc les techniques suivantes :

I — Technique par pesée

Prélèvement

Recueillir 15 ml de sang dans un tube à centrifuger renfermant 1500 mcg (soit 100 mcg par ml de sang) d'héparine sèche obtenue par évaporation sous vide sur anhydride phosphorique de 3 ml d'une solution commerciale d'héparine à 50 mg par ml diluée à 1% dans l'eau distillée (cette dilution contient donc 500 mcg par ml) ou 10 ml de sang dans un flacon d'héparine sèche à 1 mg «pour prélèvements».

Réactifs

— solution récalcifiante	{	Cl ² Ca.....	0,40 g
		ClNa	8 g
		solution de sulfate de protamine	
		à 1g. p.100.....	10 ml
		eau distillée.....	q.s.p. 1000 ml

La solution de sulfate de protamine peut être remplacée par :

— 10 ml de polybrène solution à 1 g. pour 100 ml.

ou par : — 0,20 g de bleu de toluidine.

cette solution récalcifiante est d'une bonne conservation même à la température du laboratoire.

N.B. — Le rapport de neutralisation entre l'héparine et l'un des antihéparines peut varier suivant le produit utilisé (cf page 42), avec les produits que nous avons employés,

la quantité de sulfate de protamine dans la solution récalcifiante peut neutraliser au maximum : 200 mcg d'héparine par ml de sang total.

Celle de Polybrène neutralise au maximum 500 mcg d'héparine par ml de sang total.

Celle de bleu de toluidine neutralise au maximum 100 mcg d'héparine par ml de sang total.

La concentration convenable de chaque antihéparine a été déterminée de la façon suivante en prenant comme exemple le sulfate de protamine :

D'après notre technique de prélèvement, 5 ml de plasma (soit environ 10 ml de sang total) contiennent approximativement 1000 mcg d'héparine. Pour neutraliser exactement cette quantité d'héparine, il faudrait 2000 mcg de sulfate de protamine. Les tableaux II et V nous permettent d'affirmer que 1000 mcg de sulfate de protamine par ml de plasma (soit environ 500 mcg par ml de sang total) peuvent neutraliser une quantité maximum d'héparine de 500 mcg par ml de plasma sans perturber les dosages.

Cette quantité de sulfate de protamine est donc 2,5 fois supérieure à la quantité nécessaire pour neutraliser l'héparine du plasma recueilli suivant nos indications et donne une marge de sécurité suffisante.

La formule du réactif est donc calculée pour contenir 500 mcg de sulfate de protamine dans les 50 ml ajoutés aux 5 ml plasma utilisés pour effectuer le dosage.

- solution de thrombine (1 ampoule de thrombase ROUSSEL reconstituée extemporanément à l'aide de 5 ml de soluté physiologique de ClNa à 9 g pour 1000 ml).

(Conservation : maximum quelques heures à + 4°).

- Alcool à 95°C

— Ether

— TECHNIQUE

- 1 — Centrifuger 10 minutes à 4.500 t/min. pour séparer le plasma.
- 2 — Dans un verre à pied muni d'un agitateur, mesurer 50 ml de solution récalcifiante.
- 3 — Ajouter ensuite successivement dans le verre à pied :
 - 5 ml de plasma
 - 0,5 ml de la solution de thrombine
- 4 — Agiter et rincer l'agitateur avec un peu de solution coagulante puis placer le verre à pied pendant 15 à 30 minutes à l'étuve ou au bain-marie à 37°C
- 5 — Filtrer sur un carré de toile de nylon bien propre en rinçant le verre à pied à l'aide d'eau distillée.
Former un nouet et exprimer le liquide.
Bien rassembler le coagulum avec les doigts en le plaçant sur une surface lisse et propre pour le recueillir complètement.
- 6 — Laver le coagulum en le malaxant entre les doigts sous un courant d'eau distillée.
Laver enfin le coagulum entre les doigts avec de l'alcool à 95°C puis de l'éther.
- 7 — Sècher le coagulum placé dans une capsule tarée, à l'étuve à une température voisine de 80°C — 100°C pendant une heure environ.
- 8 — Dès refroidissement, déterminer à la balance de précision le poids «p» de coagulum.

CALCULS:

Multiplier par 200 le poids «p» obtenu pour rapporter un litre de plasma et exprimer le résultat en grammes de fibrinogène par litre de plasma.

RESULTATS :

Valeurs normales pour l'adulte : 2,5 à 5 g/litre de plasma
pour le nourrisson : 2 à 3 g/litre de plasma

Hyperfibrinémies : taux > 6 gs.

Hypofibrinémies : taux $< 2,5$ gs.



II — MICHROTECHNIQUE EMPLOYANT LA REACTION

DU BIURET

PRELEVEMENT

Recueillir du sang dans un tube contenant de l'héparine sèche, à une dose de 100 mcg par ml de sang recueilli.

REACTIFS

- soluté physiologique de ClNa à 9 g pour 1000 ml.
- solution coagulante:
 - Thrombase Roussel 1 ampoule (0,22g. = 100 U.M.).
 - Soluté physiologique ClNa à 9 g pour 1000 ml : 50 ml.
 - Solution de sulfate de protamine à 1g. p. 100 ml: 0,5 ml.

(Cette solution de sulfate de protamine peut être remplacée par 0,5 ml de solution de polybrène à 1 g. %).

La solution coagulante peut être conservée 24 à 48 hs. à + 4° et en flacon bien bouché.

N.B. — La quantité d'antihéparine ajoutée au réactif coagulant peut neutraliser sans perturber les dosages au maximum 500 mcg d'héparine par ml de sang total.

- solution de soude environ N
on peut utiliser une soude pure en pastilles non carbonatée, ce qui est très rare, ou plutôt une solution de soude décarbonatée au $\frac{1}{2}$ préparée selon SOERENSEN, titrée exactement, dont on utilise la quantité correspondant à 30 g. de soude.
- Réactif du biuret selon GORNALL :

{	SO ⁴ cu 5H ₂ O	1,5 g.
	Tartrate double de K et de Na	6 g.
	Soude puré (exempte de carbonate)	30 g.
	1 K	1 g.
	Eau distillée q. s. p.	1000 ml

Conservation un an à l'obscurité en flacons paraffinés bien bouchés ou en flacons plastiques.

TECHNIQUE

- Préchauffer quelques minutes au bain-marie ou à l'étuve à 37°, 10 ml de solution coagulante dans un tube à centrifuger conique.
- Ajouter 0,5 ml de plasma (0,3 ml pour un excellent manipulateur entraîné). Agiter, maintenir 5 à 10 minutes à 37°C.
- Agiter le tube pour remettre le voile de fibrine en suspension.
- Ajouter, en versant le long des parois et en agitant doucement pour ne pas former de bulles d'air 5 à 8 ml de soluté physiologique.
- Pour séparer la fibrine, centrifuger 10 minutes à 500 t/min. et décanter, ou bien recueillir par filtration et expression dans un nouet de toile fine ou nylon.
- Bien laver la fibrine avec 1 ou 2 ml de soluté physiologique en triturant le caillot avec un petit agitateur — on peut ajouter 1/3 à 1/2 volume d'alcool (P. FLEURY (Sang 12 bis) Fiches techniques de chimie biologique).
- Après avoir éliminé les eaux de lavage dissoudre la fibrine dans un ml. de solution de soude normale, au bain-marie vers 60°C - 70°C pendant environ 5 minutes en agitant doucement avec l'agitateur.
- Refroidir vers 20° - 25° sous un courant d'eau froide.
- Préparer parallèlement un tube témoin contenant 1 ml de solution de soude normale.
- Ajouter dans les deux tubes 4ml de réactif de GORNALL. Laisser 30 minutes à la température du Laboratoire et mesurer l'intensité de la coloration développée avec un photo-

mètre à 540 m μ avec un écran vert. Ne pas oublier de centrifuger avant la lecture si le milieu n'est pas limpide.

CALCULS

Déduire l'absorption du tube témoin de celle du dosage et se rapporter, comme pour le dosage des protides sériques, à une courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions avec une solution de protéine de titre connu.

(des solutions d'albumines de protides sériques totaux et de fibrine peuvent être pratiquement considérées comme ayant le même pouvoir biurétogène).

Calculer le taux de fibrinogène par litre de plasma.

III — TECHNIQUE CHRONOMETRIQUE

PRELEVEMENT

- sang prélevé sur héparine sèche à raison de 100 mcg par ml de sang.
- séparer le plasma par centrifugation 15 minutes à 4.500 t/min.

REACTIFS ET MATERIEL

- Tampon d'OWREN-KOLLER pH = 7,35.

● Véronal sodique pur pour analyses	5,875 g
● ClNa	7,335 g
● Solution ClH 0,1N	215 ml
● Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Ajuster à pH 7,35 avec ClH 0,1N si nécessaire.

- Solution de thrombine à 50 unités N.I.H. par ml.

En raison de l'absorption de la thrombine sur le verre il faut la préparer dans un flacon siliconé en diluant 1 ampoule de thrombine ROCHE (100 mg = 6.000 unités N.I.H.) dans 120 ml de tampon d'OWREN contenant l'un des 3 antihéparines :

- soit 1 ml de solution de sulfate de protamine à 1 g. pour 100 ml. (cette quantité permet de neutraliser aux maximum 200 mcg d'héparine par ml de sang total dans chaque dosage.
- soit 1 ml de solution de polybrène à 1 g. pour 100 ml. pouvant neutraliser 400 mcg d'héparine par ml de sang total).
- soit 60 mg de bleu de toluidine (pouvant neutraliser 250 mcg d'héparine par ml de sang total).

N.B. — Nous avons vérifié que l'addition de telles quantités d'antihéparines au tampon d'OWREN-KOLLER ne modifie pas le pH.

Répartir aussitôt par petites fractions dans des tubes à hémolyse siliconés, que l'on bouche hermétiquement et congèle immédiatement à -20°C .

Avant l'utilisation, il est indispensable de les décongeler lentement à la température du laboratoire.

TECHNIQUE

- Dilution du Plasma.
- Dans les cas normaux diluer 0,1 ml de plasma dans 0,9 ml de tampon d'OWREN pur, juste avant de faire la détermination (le fibrinogène dilué est instable). Cette dilution au 1/10 contient 0,30 g à 0,40 g de fibrinogène par litre.
- Dans les hyperfibrinémies, il faut augmenter la dilution (1/20 par exemple), et dans les hypofibrinémies, il faut la diminuer (au 1/5 ou au 1/2) ou même utiliser le plasma pur pour se trouver dans les mêmes conditions de concentration en fibrinogène.
- Distribuer dans deux tubes à hémolyse de préférence étroits, diamètre = 8 mm., préchauffés à 37°C , 0,2 ml de plasma dilué.
Laisser préchauffer 1 à 2 minutes.
- Ajouter dans un tube 0,2 ml de solution de thrombine en soufflant, mélanger en déclanchant aussitôt un chronomètre et déterminer le temps de coagulation.
- Faire une nouvelle détermination sur le deuxième tube.
- Prendre la moyenne des deux résultats s'ils ne sont pas trop éloignés, si non recommencer les déterminations.

ETALONNAGE

- Déterminer le temps de coagulation obtenu avec un plasma

témoin pur, puis avec ce plasma dilué au 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, dans un tampon d'OWREN pH = 7,35

- Opérer de même avec plusieurs autres plasmas normaux.
- Déterminer pour chacun de ces plasmas la teneur en fibrinogène en opérant par pesée, soit X, Y, Z, ces taux en g. par litre de plasma pur.
- tracer une courbe d'étalonnage donnant directement le taux de fibrinogène par litre de plasma pur (alors que le plasma est utilisé dilué au 1/10 pour les déterminations dans les cas normaux).

Pour cela tracer sur papier logarithmique une courbe en portant en abscisses les concentrations en fibrinogène par litre de plasma pur, et en ordonnées les temps de coagulation en secondes. Tenant compte d'une dilution théorique au 1/10, les concentrations en fibrinogène par litre correspondant aux déterminations effectuées correspondent à :

10 X, 10 Y, 10 Z, lorsque le plasma a été utilisé pur

5 X, 5 Y, 5 Z, » » » » dilué au 1/2

2 X, 2 Y, 2 Z, » » » » » 1/5

X, Y, Z, lorsque le plasma a été dilué au 1/10

$\frac{X}{2}$, $\frac{Y}{2}$, $\frac{Z}{2}$, » » » » » 1/20

$\frac{X}{5}$, $\frac{Y}{5}$, $\frac{Z}{5}$, » » » » » 1/50

CALCULS

- se reporter à la courbe d'étalonnage,

Le résultat est obtenu directement si le plasma examiné a été dilué au 1/10.

Si la détermination est effectuée dans une zone de faible sensibilité (c'est-à-dire en dehors de la zone correspondant à environ 0,30 à 0,40 g. de fibrinogène par ml de dilution).

- effectuer, d'après le taux estimé avec cette dilution au 1/10, une nouvelle dilution convenable du plasma pour être dans la zone de sensibilité maximum et refaire la détermination.
- Tenir compte de cette dilution différente de la solution standard d'étalonnage pour calculer le résultat, en multipliant le chiffre lu sur la courbe par le facteur $K = 1/10$ dilution effectuée.

donc $K = 0,1$ si l'on utilise le plasma pur dilué au

= 0,2	»	»	»	»	1/2
= 0,5	»	»	»	»	1/5
= 1	»	»	»	»	1/10
= 2	»	»	»	»	1/20
= 5	»	»	»	»	1/50

EXEMPLES

$$\text{si la dilution} = 1/2 \quad K = \frac{\frac{1}{10}}{\frac{1}{2}} = 1/5$$

$$\text{si la dilution convenable} = \frac{1}{50} \quad K = \frac{\frac{1}{10}}{1/50} = 5$$

Pour un temps mesuré correspondant à 5 g. de fibrinogène par litre d'après la courbe, le taux réel est de 1 g. par litre si la dilution utilisée est au 1/2, de 10 g. par litre si c'est la dilution au 1/20.

Normalement, pour un plasma contenant 4 g. de fibrinogène par litre de plasma et dilué au 1/10, on trouve des temps de l'ordre de 10 à 13 secondes.

•
•

F I B R I N O L Y S E

BIBLIOGRAPHIE

— Historique

Conservé in vitro dans son propre sérum, le caillot de fibrine reste normalement intact pendant quelques jours puis il y a liquéfaction. MAC FARLANE et BIGGS (73) ont pensé que ce phénomène de lyse était dû à un enzyme protéolytique. Les travaux de CHRISTENSEN (28), KAPLAN (45), et CHRISTENSEN et MACLEOD (29) ont établi que la fibrinolyse pouvait se produire par l'activation d'un zymogène normalement présent dans le sang.

Ce zymogène précurseur inactif aujourd'hui appelé plasminogène, a été nommé par différents auteurs profibrinolysine, tryptogène.

La plasmine, enzyme actif ou fibrinolysine que SEEGERs et LOOMIS (95) ont extraite et purifiée à partir du plasma du bœuf, serait l'enzyme résultant de l'activation du plasminogène (70). L'activation se ferait par différents processus en présence de streptokinase.

KAPLAN (46), TROLL (105), MOUNTER (80) et RONWIN (92) ont montré qu'il s'agit d'un mécanisme d'activation différent de celui du système trypsinogène-trypsine.

Les Kinases sont spécifiques, la Streptokinase n'agit pas sur le trypsinogène, et l'entérokinase n'a pas d'action sur le plasminogène (45).

La protéolyse de la caséine par la trypsine est beaucoup plus poussée qu'avec la plasmine. Préalablement soumise à l'action de la plasmine, la caséine est encore hydrolysée par la trypsine, mais

la plasmine est sans effet sur les produits de digestion trypsique de la caséine (29).

La plasmine est moins sensible aux inhibiteurs (organo phosphates, ions métalliques) que la trypsine (80, 92).

PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

DES FACTEURS DE LA FIBRINOLYSE

● PLASMINOGENE

a) propriétés physiques

SCHULMAN et COLL. (98), DAVIES et ENGLERT (33) ont étudié les propriétés physiques du plasminogène purifié.

C'est une euglobuline insoluble dans l'eau, soluble dans les solutions salines, non dialysable, thermolabile, ayant un poids moléculaire de 83,800 et un point iso-électrique vers pH 5,6 — 6,0.

b) Propriétés chimiques

Préparé par la méthode de KLINE, le plasminogène contient approximativement 1% d'hexoses, 0,19% de phosphore et 15,8% d'azote. Le rapport Tyrosine sur Tryptophane serait de 1/1,56 (87, 98).

● PLASMINE

a) — Propriétés physiques

Euglobuline insoluble dans l'eau, non dialysable et thermolabile, ayant un poids moléculaire variant entre 108.000 et 127.000 (33).

b) — Propriétés chimiques

La plasmine contient 1,5% d'hexoses, 14,1% d'azote (98), le rapport tyrosine sur Tryptophane est le même que celui trouvé pour le plasminogène.

N.B. — Solubilité du plasminogène et de la plasmine en fonction du pH.

Le plasminogène et la plasmine ont les mêmes propriétés de solubilité. Très solubles au-dessous de pH 5 et au-dessus de pH 9 (81), difficilement solubles dans la zone de pH intermédiaires (2).

ACTIVATEURS DU PLASMINOGENE

La transformation du plasminogène inactif en plasmine active peut se faire sous l'action de divers « activateurs » dont les principaux peuvent être classés en deux groupes :

A) Activateurs d'origine bactérienne

B) Activateurs d'origine tissulaire ou humorale.

● ACTIVATEURS D'ORIGINE BACTERIENNE:

a) — Le streptokinase (SK).

En 1933, TILLET et GARNER (100) ont montré que des filtrats de culture de diverses souches de streptocoque hémolytique peuvent lyser des caillots de sang en présence d'un facteur extrait du plasma humain, identifié au plasminogène (29, 101). Ce produit bactérien capable de lyser la fibrine a été appelé par CHRISTENSEN Streptokinase (29).

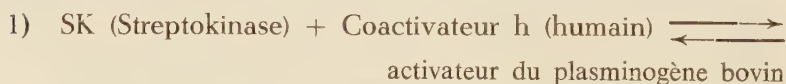
La streptokinase n'a pas d'activité protéolytique propre. TILLET et COLL. (102), GARNER ET COLL. (101) ont montré qu'elle n'attaquerait pas les esters de la lysine et de l'arginine, facilement hydrolysés par la plasmine ou la trypsine (83,105).

Son seul rôle connu jusqu'à présent consiste à catalyser la transformation du plasminogène en plasmine.

La streptokinase utilisée couramment provient d'une souche pathogène de streptocoque d'origine humaine; elle active le plasminogène du plasma humain ainsi que celui des chats, chiens, lapins, mais pas le plasminogène du plasma bovin (82).

MULLERTZ et LASSEN (82) ont montré que pour activer le plasminogène bovin, il fallait ajouter une petite quantité de globulines humaines au mélange streptokinase et plasminogène bovin.

Ces auteurs ont schématisé ce mode d'activation par les deux équations suivantes :



2) Activateur + plasminogène bovin $\longrightarrow$ plasmine — mais on n'a jamais démontré de façon certaine que plasminogène et co-activateur soient deux entités différentes.

Actuellement l'existence d'un facteur différent du plasminogène «pro-activateur» est cependant admise par la plupart des auteurs.

b) — la Staphylokinase

Une toxine de certaines souches virulentes de staphylocoques dorés, la staphylokinase (55), active le plasminogène en plasmine chez l'homme, le chien, le chat mais non chez le rat et le bœuf.

● **ACTIVATEURS D'ORIGINE TISSULAIRE**

OU HUMORALE

a) **Fibrinokinase**

Identifiée par ASTRUP et PERMIN (8) dans les tissus, cette Kinase est capable de transformer dans des conditions sensiblement stoechiométriques (8) le plasminogène en plasmine.

Le tissu pulmonaire, le cerveau, l'utérus et le rein en sont très riches.

b) **Plasmine**

CHRISTENSEN (30) pense que le plasminogène peut se transformer en plasmine par action autocatalytique après élimination d'un inhibiteur présent normalement dans le plasma (extraction par le chloroforme par exemple).

c) **L'urokinase** (U K)

Protéine présente dans l'urine des mammifères, l'urokinase, catalyse la transformation du plasminogène en plasmine, en agissant directement sur le plasminogène sans intervention du proactivateur ; son action a été surtout étudiée en 1957 par KJELGAARG et PLOUG (48) et en 1958 par ALKJAERSIG et COLL. (2) ; L'urokinase hydrolyse la caséine et certains substrats synthétiques comme l'ester méthylique de l'acide N toluène sulfonique ou $\text{— N — toluène-sulfonyl — méthyl ester (T.S.M.E.)}$, l'ester méthylique de l' $\text{N — benzoyl — L — arginine}$ ou $\text{benzoyl — L — arginine — méthyl — ester (B.A.M.E.)}$ et l'ester éthylique de la L — lysine ou $\text{L — lysine — éthyl ester (L.E.E.)}$ (91 bis.)

d) **la Trypsine**

L'activation du plasminogène par la trypsine a été étudiée sur-

tout par ALKJAERSIG et COLL. (2), et serait identique à celle due à la plasmine.

I N H I B I T E U R S

Inhibiteurs de la transformation du plasminogène en plasmine

a) L'acide Epsilon amino-caproïque (ou nor-leucine) est un inhibiteur de l'activation du plasminogène et aussi de la plasmine mais à forte concentration seulement, alors qu'il l'active à faible concentration. L'action principale se situe donc sur l'activation du plasminogène (3).

b) Le diisopropylfluorophosphate (D.F.P.) inhibiteur de la trypsine et de la chymotrypsine, inhibe la transformation du plasminogène en plasmine par la streptokinase (3).

c) Il existe des inhibiteurs de la streptokinase, de la staphylokinase. Ce sont les anticorps spécifiques anti-streptococciques et anti-staphylococciques (64).

● Inhibiteurs de la plasmine

a) La plasmine est physiologiquement inhibée par le sérum qui contient un ou plusieurs inhibiteurs (97), les expériences semblent montrer que cette activité antiplasmine se trouve localisée dans la zone des bêta 1 et bêta 2 globulines (87,49).

NORMAN (87) a montré que l'inhibiteur contenu dans les bêta 2 globulines est plus thermostable que celui existant dans les bêta 1 globulines.

b) L'inhibiteur contenu dans le soja, agirait d'après KLINE et FISHMAN (49) en bloquant l'activité protéolytique de la plas-

mine sans empêcher la transformation du plasminogène en plasmine.

c) les organophosphates, les sels des métaux lourds (cuivre, nickel, cobalt, zinc) inhibent également la plasmine (80,51).

d) Inhibiteur de KUNITZ (53):

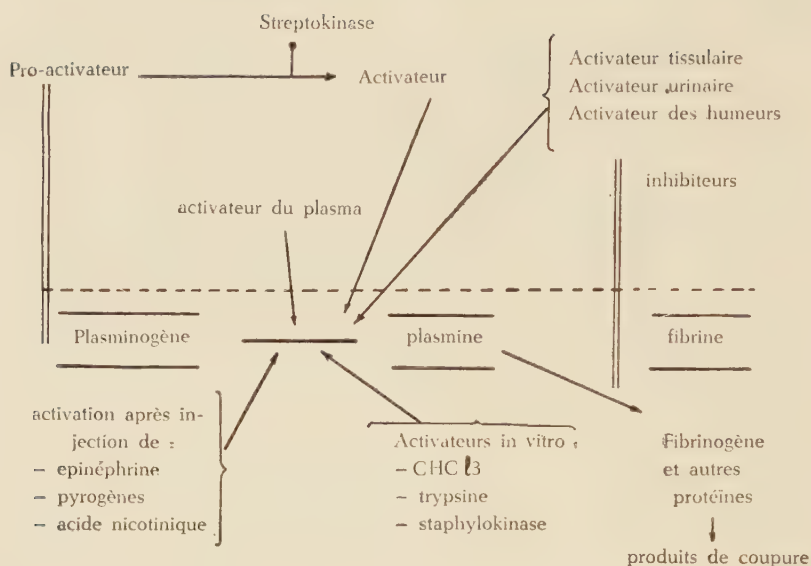
C'est un polypeptide isolé par KUNITZ et NORTHROP (53,54) à partir du pancréas, dont le poids moléculaire se situe aux environs de 9.000. Sa structure n'est pas encore connue, c'est un inhibiteur de certaines peptidases en particulier de la trypsine, la chymotrypsine et la plasmine.

Son action est relativement spécifique de certaines peptidases, il inhibe par exemple le centre actif de l'action peptidasique de l'élastase et de l'élastomucoprotéine sans intervenir sur les autres activités de ces enzymes.

Son action s'explique par la formation stoechiométrique d'un complexe avec l'enzyme.

— SYSTEME ENZYMATIQUE DE LA FIBRINOLYSE

Plusieurs schémas ont été proposés pour expliquer ce système; mais ils restent peu satisfaisants pour l'esprit. Car, d'une part la plus grande partie des travaux ont été effectués avec des produits incomplètement purs, d'autre part la plupart des auteurs évoquent un mécanisme enzymatique régi par différentes substances dont l'existence n'a jamais été nettement démontrée. On peut cependant tenter de résumer brièvement l'essentiel des données, en reproduisant un schéma de BLIX (18) qui nous paraît assez démonstratif:



— SUBSTRATS PROTEIQUES ET SYNTHETIQUES

DE LA PLASMINE

La fibrine est le substrat le plus naturel et le plus sensible à l'activité lytique de la plasmine, mais elle présente l'inconvénient majeur de n'être pas très pure; elle est en particulier souillée par des quantités plus ou moins importantes de plasminogène. C'est pourquoi beaucoup d'auteurs déterminent l'activité protéolytique de la plasmine sur les substrats synthétiques ou naturels :

caséïne, gélatine, etc...

Le plasmine digère bien la caséine (1, 6), la gélatine (30) et la bêta — lactoglobine (31). Elle hydrolyse également des substrats synthétiques qui sont des esters de l'arginine et de la lysine, tels que la T.A.M.E. (tosyl-arginine-méthylester), la B.A.M.E. (benboyl-arginine - méthylester), le L.E.E. (lysine-éthylester), la L.M.E. (lysine-méthylester) (105). Le pH optimum est de 8,0 pour l'hydrolyse des esters de la lysine (105).

ETUDE ANALYTIQUE DU SYSTEME FIBRINOLYTIQUE

● **Dosage du plasminogène**

— Principe.

Le plasminogène est dosé après conversion en plasmine par addition d'une quantité optimale de streptokinase.

Plusieurs techniques ont été proposées pour son évaluation.

Les plus connues sont :

a) **La technique de NIEWIAROVSKI** (84) qui consiste à activer par une solution de streptokinase à 200 u/ml différentes dilutions (en progression arithmétique) du plasma à étudier, et estimer l'activité fibrinolytique à l'égard d'un substrat constitué par du fibrinogène purifié coagulé par la thrombine.

b) **La technique de SCHWERT et TAKENAKA** (94) utilisant le B.A.M.E. comme substrat, la détermination par spectrophotomètre à 258 m μ de la différence d'absorption après action d'un échantillon plasmatique à étudier non activé, et parallèlement d'un échantillon activé par la streptokinase permet l'estimation du plasminogène.

c) La technique caseinolytique (cf page 71).

● Dosage de la plasmine libre :

pouvant se faire — soit par la technique de NIEWIAROVSKI (84) qui consiste à faire agir le plasma pathologique sur un caillot créé par action de la thrombine sur le fibrinogène et mesure du temps de lyse.

— soit par la technique d'ASTRUP (9) : étude de l'activité lytique spontanée sur les plateaux de fibrine.

— soit par la technique de REMMERT et COHEN (91) : protéolyse de la caséine par le plasma pathologique.

● Dosage des effecteurs.

A/ — Activateurs et pro-activateurs ; par les techniques de FLETCHER (38), GUEST et CELANDER (40), ou selon BLIX (19).

B/ — Inhibiteurs ou Antiplasmines par les techniques de NIEWIAROVSKI (85), FLETCHER (39) ou VON KAULLA (109).

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE DU DOSAGE DU PLASMINOGENE

Principe :

Détermination du plasminogène par activation avec la streptokinase et mesure de l'activité caséinolytique de la plasmine formée.

La plasmine possède une action caséinolytique qui se traduit par la libération de tyrosine. L'évaluation spectrophotométrique de cet acide aminé dans un filtrat après protéolyse dans des conditions déterminées, permet par conséquent le dosage de la plasmine, ou du plasminogène après sa transformation quantitative en plasmine par action de la streptokinase.

— TECHNIQUE CHOISIE

REMMERT et COHEN (91) ont établi une technique basée sur ce principe, extension de la méthode classique d'ANSON et MIRSKY pour l'étude des protéinases. Cette technique a été modifiée par divers auteurs, en particulier par FLETCHER (38) ALKJAERSIG, FLETCHER et SHERRY (3) etc...

Nous avons essayé une technique basée sur ces travaux.

Pour effectuer le dosage du plasminogène il faut éliminer autant que possible les effecteurs (inhibiteurs et certaines protéines plasmatiques plasmino-sensibles) par conséquent opérer sur le précipité d'euglobulines séparées du plasma qui contient la totalité du plasminogène (cf. page 87)

Les premiers essais effectués avec cette technique ne nous ont pas donné satisfaction. Nous avons donc été amenés à étudier point par point tous les stades du dosage pour rechercher les causes d'er-

reur et mettre au point notre technique.

D'abord, se pose le problème de l'établissement de la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre. Nous avons utilisé le spectrophotomètre «MAROC» les lectures ont été faites à 275 m μ en cuves de quartz, le zéro de l'appareil étant réglé sur l'eau distillée.

ETABLISSEMENT DE LA COURBE D'ETALONNAGE

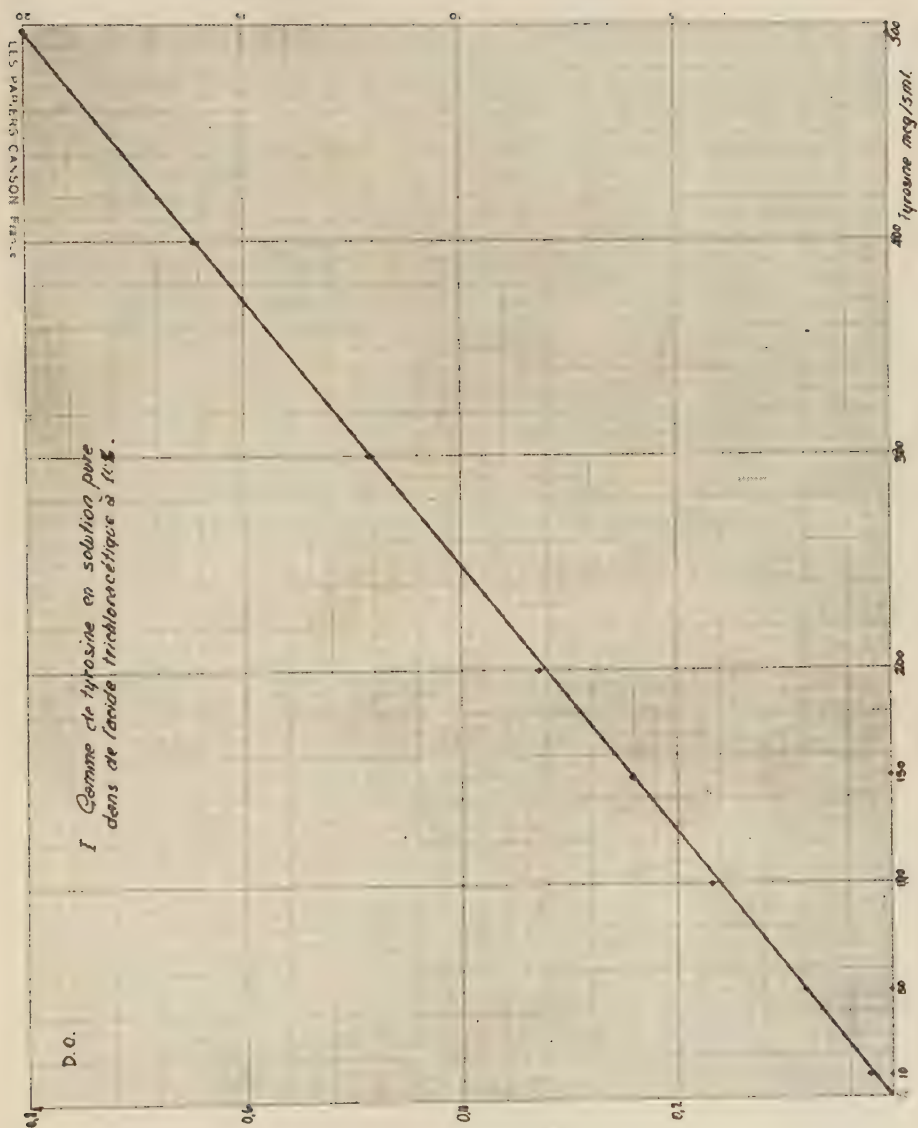
1°/ solution pure

Etablissement de la courbe d'étalonnage d'une gamme de tyrosine pure dissoute dans de l'acide trichloracétique à 10 g.p. 100 ml (10%). Une gamme de tyrosine pure en solution dans de l'acide trichloracétique à 10% sans caséine, ni autres réactifs, lue au spectrophotomètre donne des valeurs de densités optiques (D.O.) proportionnelles aux quantités de tyrosine, et la courbe d'étalonnage est une droite passant par l'origine (**courbe 1**).

Tyrosine (mcg)	D.O.
10	0,020
50	0.085
100	0,172
150	0,240
200	0,333
300	0,475
400	0,635
500	0,795

2°/ Milieu complexe

Nous avons constaté que la centrifugation simple préconisée de tyrosine ajoutée aux filtrats du mélange d'incubation (caséine, tampon, acide trichloracétique à 10%) ne donnait pas des densités



optiques proportionnelles aux quantités de tyrosine ajoutées.

a) stabilité de la tyrosine dans le filtrat

Nous avons supposé qu'il pouvait y avoir destruction de la tyrosine dans le filtrat.

Les résultats de lectures effectuées immédiatement, 15, 30, 60 minutes après filtration sur 27 déterminations nous ont montré un écart maximal de $+ 0,015$; ces écarts peuvent être considérés comme la marge d'erreur possible dans les lectures et permettent d'affirmer que la tyrosine est stable dans le filtrat au moins 1 heure.

Les filtrats des dosages contenant la tyrosine, conservés dans des tubes à hémolyse bouchés à $+ 4^{\circ}$ et à l'abri de la lumière montrent une diminution de l'ordre de 3 à 15 pour 100 en 72 h. suivant les cas.

Il ne faut donc pas attendre trop longtemps avant d'effectuer les lectures au spectrophotomètre.

b) Stabilité de la tyrosine en cours d'incubation

Nous avons vérifié aussi (tableau VIII) qu'une surcharge en tyrosine dans des dosages d'activité caséinolytique d'euglobulines, effectués parallèlement sur un même mélange de plasma, donnait la même augmentation de densité optique que les témoins également surchargés.

La surcharge en tyrosine a été obtenue en saturant de tyrosine le tampon pH 8,0 employé dans le dosage et le témoin.

TABLEAU VIII

	DENSITES OPTIQUES		
Dosages non surchargés	0,275	0,280	0,270
Témoins non surchargés	0,145	0,145	0,140
Différence D. O.	0,130	0,135	0,130
Dosages surchargés	0,405	0,410	0,400
Témoins surchargés	0,280	0,275	0,275
Différence D. O.	0,125	0,135	0,125

Nous pouvons donc **conclure** que la tyrosine n'est pas détruite au cours de l'incubation à **37°C.**

c) Importance de la centrifugation ou de la filtration

Nous avons constaté que la centrifugation simple préconisée par certains auteurs ne donnait pas toujours un surnageant parfaitement limpide, il fallait donc filtrer.

Nous avons essayé une filtration sur papier filtre DURIEUX (111 sans cendre, filtration rapide), sur laine de verre ordinaire, (qui donne des filtrats troubles), et sur coton de verre spécial (Prolabo hyperfin) sans obtenir des résultats valables.

Monsieur VAIREL (E) nous ayant signalé avoir déjà constaté des ennuis causés par la qualité des papiers filtres pour d'autres dosages nous avons vérifié l'influence des filtres sur nos mesures.

Sur 10 échantillons d'un même lot de papier filtre (111 Du-

rieux, filtration rapide) et de coton de verre spécial (Prolabo hyperfin), nous avons fait passer 5 ml d'un mélange voisin du mélange obtenu au cours du dosage contenant 60% d'acide trichloracétique à 10% et 40% du mélange utilisé pour l'étalonnage mais sans caséïne, ni streptokinase

(soluté physiologique de ClNa 1 ml
tampon phosphate pH 8 10 ml)

pour se placer dans des conditions opératoires proches de celles de la technique.

TABLEAU IX

Echantillons filtres	DENSITES OPTIQUES									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
111 Durieux	0,230	0,320	0,260	0,220	0,284	0,250	0,365	0,285	0,235	0,250
Coton hyperfin	0,207	0,214	0,174	0,184	0,164	0,184	0,200	0,161	0,186	0,154

Les résultats donnés dans le tableau IX montrent que des différences énormes de densités optiques sont observées.

Nous avons soumis les filtres à des lavages successifs avec le mélange (60% d'acide trichloracétique à 10%, 40% de tampon pH 8) et nous avons constaté comme le montre le tableau X

TABLEAU X**DENSITES OPTIQUES**

Filtrations	1 ère	2 ème	3 ème	4ème	5 ème	6 ème
111 Durieux	0,170	0,140	0,100	0,097	0,090	0,087
coton hyper-fin	0,140	0,120	0,090	0,086		

que l'absorption du filtrat diminuait au fur et à mesure des lavages et qu'il fallait 5 à 6 lavages successifs pour obtenir un filtrat présentant la même densité optique que le liquide non filtré soit 0,086. Le coton de verre, cédant moins de substances absorbant à 275 m μ et son lavage étant rapide et plus facile, nous le préférons pour l'utilisation courante.

D'autre part la filtration étant assez lente lorsque la totalité du précipité de caséïne est versée sur le filtre, nous préférons faire d'abord une centrifugation de quelques minutes à 4.500 t/min. et filtrer le surnageant.

c) Etude de la courbe d'étalonnage avec les filtres lavés.

Nous avons recommencé une gamme d'étalonnage en ajoutant des quantités croissantes de tyrosine dans l'acide trichloracétique à 10 % ajoutée pour précipiter le mélange (caséïne, tampon, etc...) suivant la technique que nous décrivons ci-dessous. En utilisant des filtres lavés nous avons obtenu cette fois les valeurs suivantes :

<u>Filtre Durieux lavé</u>		<u>coton de verre hyperfin</u>	
<u>tyrosine</u>	(mcg)	<u>D.O</u>	
	10	0,030	
	50	0,080	
	100	0,170	
	150	0,250	
	200	0,310	
	300	0,465	
	400	0,620	
	500	0,765	

<u>tyrosine</u>	(mcg)	<u>D.O</u>	
	10	0,028	
	50	0,085	
	100	0,175	
	150	0,250	
	200	0,310	
	300	0,465	
	400	0,635	
	500	0,800	

La courbe d'étalonnage (II) est une droite se superposant exactement à celle obtenue avec la tyrosine en solution pure (cf page 72) Par conséquent nous pouvons conclure qu'il n'y a pas d'absorption de tyrosine sur le précipité de caséine.

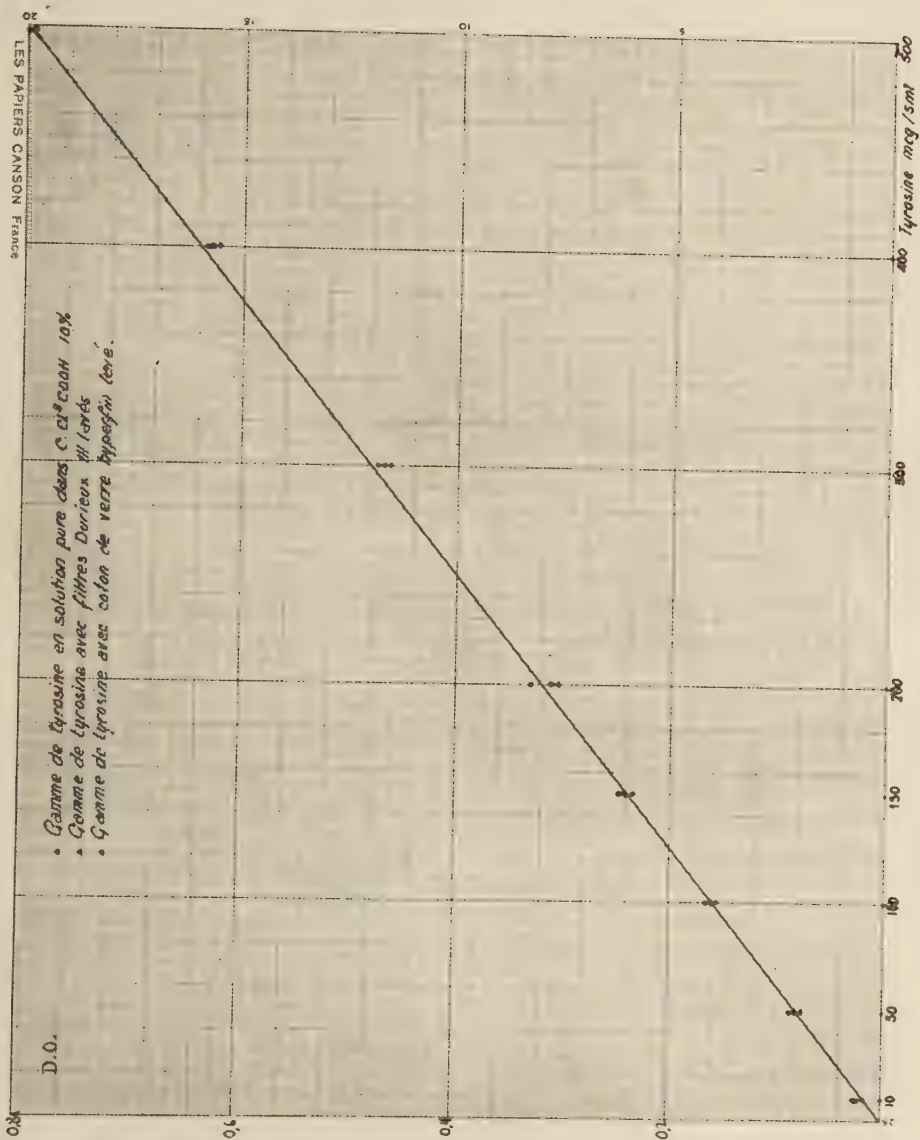
TECHNIQUE DE DOSAGE DU PLASMINOGENE

PLASMATIQUE PAR CASEINOLYSE

Technique utilisée par nous pour l'étalonnage et le dosage.

REACTIFS ET MATERIEL

- 1 — Plasma citraté frais (12 ml de sang prélevé sur 0,6 ml de solution de citrate trisodique 5,5 OH₂ à 9 g. pour 100 ml).
 - 2 — Courant de CO₂
 - 3 — ou solution d'acide acétique
 - 4 — solution de streptokinase (1) (SK) à 2.000 u/ml
- (1 flacon de SK 10.000 U.



5 ml de tampon MICHAELIS pH 7,3)

5 — Tampon phosphate de SOERENSEN pH = 8,0 0,15 M

- { solution A : $\text{Po}^4 \text{H}_2\text{K}$ M/15 : 9 g,078 p. 1000 ml
- { solution B : $\text{Po}^4 \text{HNa}^2$, 12 OH_2 M/15 : 23 g,87 p. 1000 ml

mélanger extemporanément 94,5 ml de solution B à 5,5 ml de solution A et ajuster à pH 8,0 au pH mètre avec l'une des deux solutions mères.

6 — solution de caséïne purifiée contenant environ 3 g. pour 100 ml dans du tampon de SOERENSEN.

(9 grammes de caséïne pure "Hammarstein quality" Merck
3000 ml de tampon phosphate pH 8,0)

a) Purification de la caséïne

- dissoudre puis porter au bain-marie bouillant pendant 15 minutes.
Refroidir.
- Acidifier par l'acide chlorhydrique environ N ajouté par petites quantités (35 à 40 ml) jusqu'à obtenir un pH = 2,0 mesuré au pH mètre.
- Ajouter alors lentement en agitant 45 ml de solution d'acide perchlorique 1,7 M (162 ml de solution d'acide perchlorique R.P. à 65 pour 100 ml).
- Maintenir une nuit à + 4°
- Centrifuger et laver abondamment à l'eau le précipité jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus acide.
- Reprendre le précipité par 300 ml de tampon phosphate pH 8,0.

(1) Streptokinase, fournie par les laboratoires CHOAY.

— Filtrer sur filtre Durieux lavé comme ci-dessous (ne cédant plus de substances absorbant à 275 m μ)

— Répartir par fractions de 15 - 20 ml dans des petits flacons à pénicilline et congeler à -20°C .

b) **Utilisation** : décongeler **lentement** (à la température du laboratoire au moment de l'emploi.)

7 — solution d'acide trichloracétique R.P. à 10 g. pour 100 ml d'eau distillée.

8 — soluté physiologique de chlorure de sodium R.P. à 9 g. pour 1000 ml.

9 — coton de verre «hyperfin Prolabo» lavé au mélange :

{	tampon phosphate pH 8,0	40%
	acide trichloracétique	10% 60%

puis rincé à l'eau distillée, séché et contrôlé (eau de lavage donnant une densité optique égale à celle de la solution non filtrée).

10 — Spectrophotomètres «MAROC», le zéro étant réglé sur l'eau distillée.

TECHNIQUE

I — Prélèvement et préparation du Plasma

a) recueillir par ponction veineuse du sang sur anticoagulant.

b) recueillir après centrifugation du sang pendant 15 minutes à 4.500 t/min. le plasma surnageant.

c) précipitation des euglobulines.

— par la méthode de VON KAULLA (108) avec un **courant** de Co_2 .

— par la méthode à l'acide acétique de NIEWIAROVSKI (84)

II — Hydrolyse de la caséïne

a) Dans un tube à essai A, préparer un mélange suivant les indications ci-dessous, en introduisant les réactifs dans l'ordre et en mélangeant après chaque addition:

Réactifs	T u b e A	
solution de Caseïne (R.6)	3 ml	
tampon phosphate pH = 8,0 (R.5)	2,5 ml	
solution d'euglo- bulines (R.6)	0,25 ml	
solution SK (R.4)	0,25 ml	
Volume total	6,00 ml	

Le pH du mélange est de 7,8 à 8,0 pH optimal pour l'action caséïnolytique de la plasmine (3).

b) Prélever aussitôt 2 ml du mélange que l'on porte dans un tube à hémolyse à centrifuger a, contenant 3 ml de solution d'acide trichloracétique (R.7).

- Mélanger puis laisser le tube 30 minutes à la température du Laboratoire.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4500 t/min. puis filtrer sur coton de verre lavé.

Le liquide limpide obtenu servira de blanc pour le dosage.

c) Aussitôt après avoir prélevé les 2 ml dans le mélange, por-

ter celui-ci au bain-marie à 37°C et le laisser incuber 60 minutes exactement.

— transvaser alors 2 ml du mélange dans 1 tube à hémolyse à centrifuger A contenant 3 ml d'acide trichloracétique (R. 7) pour arrêter l'action enzymatique comme ci-dessus. Opérer ensuite de la même manière (30 minutes de contact, centrifugation et filtration).

III — Mesure de la tyrosine libérée

Les densités optiques des liquides limpides obtenus avec le blanc et la mesure d'activité sont mesurées au spectrophotomètre.

- L'augmentation de densité optique entre les tubes a et A est due à la libération de tyrosine par hydrolyse de la caséine.
- Par conséquent déduire la densité optique du blanc (tube a) de celle du liquide (tube A) où l'on a effectué la mesure d'activité enzymatique.
- traduire la valeur ainsi calculée en mcg de tyrosine libérée en se reportant à une courbe d'étalonnage établie de la manière ci-dessous. (soit X mcg de tyrosine la quantité de tyrosine libérée dans l'essai).
- Pour transformer cette quantité de tyrosine en unités caséine. SHERRY et FLETCHER (3) avaient proposé une unité correspondant à la libération de 180 mcg de tyrosine en 1 heure à 37°C, à pH 7,8 par ml de plasma. Ils effectuaient le calcul suivant :

$$\frac{X \times 12}{180} = \frac{X}{15}$$

puisque la quantité libérée dans l'essai correspond à $\frac{0,25 \text{ ml}}{3}$

de plasma (0,25 ml d'euglobulines sous un volume total de 6 ml, dont on utilise 2 ml pour la détermination).

En application des décisions récentes de l'Union Internationale de Biochimie, nous exprimons nos résultats en Unités définies comme le nombre des micromolécules de Tyrosine libérées par minute par un litre de plasma dans les conditions opératoires strictes que nous avons suivies : pH, force ionique, température, nature des tampons etc...

Le calcul s'effectue de la façon suivante :

$$\frac{X \times 12 \times 1.000}{181 \times 60} = X \times 1,10$$

Dans ces conditions, une unité correspond sensiblement à $\frac{1}{16,5}$ Unités SHERRY, et une unité SHERRY à 16,5 unités.

IV. — Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre

1° — Préparer d'abord une solution de tyrosine pure à 100 mcg pour 3 ml.

Tyrosine pure pesée avec précision	16,6 mg
Solution d'acide trichloracétique (R.7)	500 ml

conserver en flacon bouché émeri à + 4°.

2° — Effectuer dans deux séries de six tubes à essai (pour effectuer chaque tube de gamme en double) les mélanges suivants:

Tubes	0	1	2	3	4	5
solution Tyrosine 100 mg/ 3 ml	0	1	2	4	8	10 ml
sol. acide Trichloracétique (R.7)	10	9	8	6	2	0 ml
mcg tyrosine dans 3 ml	0	10	20	40	80	100

3° — transvaser 3 ml de chacune de ces dilutions dans 12 tubes à hémolyse à centrifuger marqués 0, 0', 1, 1' etc... les tubes «O» correspondent donc au «blanc» ne contenant pas de tyrosine.

4° — Préparer un mélange contenant les mêmes proportions des divers réactifs que celles utilisées pour le dosage sauf le plasma (remplacée par du soluté physiologique).

solution de Caséine (R.6)	12 ml
tampon phosphate pH.8,0. (R.5)	10 ml
soluté physiologique (R.8)	6 ml
solution de SK (R.4)	1 ml

5° — Répartir rapidement 2 ml de ce mélange dans les 12 tubes à hémolyse renfermant 3 ml de solution en quantité croissante de tyrosine dans l'acide trichloracétique.

6° — Mélanger aussitôt, attendre 30 minutes à la température du laboratoire, centrifuger, puis filtrer sur coton de verre spécial

lavé, lire au spectrophotomètre en cuves de quartz et à $275\text{ m}\mu$ le zero de l'appareil étant effectué avec de l'eau distillée (conditions identiques à celles des mesures).

7° — Dédire la valeur de la densité optique correspondant aux tubes témoins «O» de celle des autres tubes et établir la courbe d'étalonnage sur papier millimétrique.



ETUDE DES DIFFERENTS TEMPS DU DOSAGE

I — PRECIPITATION DES EUGLOBULINES

Plusieurs auteurs (MILSTONE (78), VON KAULLA (108), NIEWIAROVSKI (84), ont étudié les modalités d'obtention des euglobulines et leur composition.

Il ressort de ces différents travaux que les euglobulines représentent 10% des protéines totales du plasma, contiennent presque en totalité le plasminogène, le facteur V et le facteur antihérophilique A, et à des taux variables mais toujours réduits le fibrinogène, le facteur VII, et le facteur antihérophilique B (traces). Elles renferment seulement des traces d'antiplasmines.

a) mode de précipitation

Plusieurs techniques ont été proposées. Nous avons choisi et composé les deux techniques suivantes :

A — La technique de NIEWIAROVSKI (84)

B — La technique de VON KAULLA (108)

A — Technique de NIEWIAROVSKI

Introduction : Cette technique dérive de celle de KOWARZYK et BULUK (52,24) très voisine de celle proposée par MILSTONE (78).

Principe

Précipitation des euglobulines du plasma à tester dilué avec de l'eau distillée après acidification par une solution d'acide acétique à 1 pour 100 ml.

Réactifs et Matériel

- 1 — Plasma recueilli sur mélange de Wintrobe desséché
- 2 — eau distillée
- 3 — solution d'acide acétique pur à 1 pour 100 ml.
- 4 — béchers de 50 ml
- 5 — tubes à centrifuger coniques de 40 ml
- 6 — tampon de PALITSCH pH = 7,6

Solution A : borate de sodium à 0,05 M : 19,108 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ OH}_2$ pour 1000 ml d'eau distillée

Solution B: solution d'acide borique 12,404 g H_3BO_3 et 2,925 g Na cl pour 1 litre d'eau distillée

Mélanger 1,2 partie de la solution de borate et 8,8 parties de la solution d'acide borique (pH = 7,6).

TECHNIQUE

- Dans un bécher de 50 ml contenant 16 ml d'eau distillée à la température du laboratoire
- introduire 1 ml de plasma à étudier
- Ajouter 0,15 ml d'acide acétique à 1 p. 100
- Agiter à la main, transvaser le contenu du bécher dans un tube à centrifuger de 40 ml.
- Abandonner à + 4° pendant 30 minutes
- Centrifuger pendant 10`minutes` à 4.500 t/min.
- Eliminer le surnageant par retournement du tube
- Sécher les parois du tube avec du papier filtre, et reprendre le précipité avec 1 ml de tampon pH 7,6 (R.6)
- Dissoudre en agitant avec un agitateur fin au bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution complète (5 minutes environ).

B/ — Technique de VON KAULLA

PRINCIPE

Précipitation des eugobulines du plasma à tester, dilué avec l'eau distillée après acidification à pH 5,2 à 5,3 par un courant de CO_2

REACTIFS et MATERIELS

- 1 — Plasma recueilli sur solution de citrate (1 ml pour 10 ml de sang total)
- 2 — eau distillée
- 3 — Détendeur pour CO_2 comprimé
- 4 — flacons d'erlenmeyer de 50 ml
- 5 — Tubes à centrifuger coniques de 40 ml
- 6 — Mélange tampon pH = 7,6, Tampon Michaelis pH 7,3 : 1 ml
soluté physiologique CNa : 2,5 ml
solution de citrate trisodique
3,8 g. p. 100 : 0,5 ml

le citrate de sodium a été ajouté pour éviter parfois une coagulation spontanée de la solution des euglobulines, le pH est ajusté à 7,6 avec une solution du soude.

TECHNIQUE

Dans un erlenmeyer contenant 15 ml d'eau distillée à la température du laboratoire :

- introduire 1 ml de plasma à étudier
- mettre en contact le mélange durant 3 à 4 minutes avec un courant de CO_2 (en agitant doucement pour éviter la mousse)
- les euglobulines précipitent
- transvaser le contenu de l'erlenmeyer dans un tube conique à centrifuger de 40 ml

- centrifuger 10 minutes à 4500 t/min., éliminer le surnageant par retournement du tube
- sécher les parois du tube avec du papier filtre. Le précipité est repris par 1 ml de tampon pH = 7,6 (R.6)
- dissoudre en agitant avec un agitateur fin au bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution complète (5 minutes environ).

b/ — Détermination du pH optimal de précipitation des euglobulines

Nous avons procédé à la détermination du pH optimal de précipitation des euglobulines correspondant au maximum d'activité caséïnolytique :

1° — par la technique de VON KAULLA

2° — par la technique de NIEWIAROVSKI,

en faisant varier le pH de précipitation et en déterminant sur le précipité le plasminogène suivant la technique décrite précédemment (page 78)

1° — Variations de l'activité caséïnolytique du plasminogène des euglobulines obtenues par action de CO₂ (VON KAULLA) en fonction du pH.

Les euglobulines ont été précipitées à des pH différents obtenus par un courant de CO₂ à débit constant, pendant des durées de contact différentes : après chaque essai le pH a été mesuré immédiatement, et le plasminogène dosé par caséinolyse. Dans chaque série d'essais, avant le passage du courant de CO₂, le pH du plasma dilué a été mesuré, ce pH constitue le pH de départ.

Protocole opératoire

Plusieurs protocoles opératoires ont été décrits :

- saturation avec un courant de CO_2 de l'atmosphère de l'erylenmeyer contenant le plasma dilué, et agitation douce à la main (VON KAULLA).
- barbotage du CO_2 dans un bécher contenant le plasma dilué et agitation magnétique.

Pour notre part nous avons adopté le mode opératoire suivant :

- Deux détendeurs successifs « CAHOMET » branchés sur une bouteille de CO_2 comprimé permettent de faire passer le gaz à une pression d'environ 1 bar et un débit constant dans un bécher de 50 ml contenant le plasma dilué à environ 5 à 10 mm. au-dessus du niveau du mélange au moyen d'un raccord en caoutchouc terminé par une pipette pasteur.

L'agitation magnétique ne s'est pas révélée nécessaire. Des essais effectués parallèlement sous un même courant de CO_2 avec et sans agitation magnétique nous ont montré une évolution identique du pH dans les deux cas (tableau XI)

TABEAU XI

Euglobulines précipitées	pH mesuré toutes les 30 secondes						
avec agitation magnétique	6,60	6,46	6,42	6,36	6,28	6,25	6,20
sans agitation magnétique	6,60	6,42	6,40	6,32	6,27	6,25	6,22

Le courant de CO_2 agite suffisamment le mélange pour homogé-

néïser le tout.

Un « réchauffeur » électrique branché sur le détendeur ou à défaut un chiffon imbibé d'eau bouillante, permet d'éviter la formation de givre dans les détendeurs, ce qui risque de causer des variations et des sauts dans le débit gazeux.

Après un temps de passage déterminé le pH est mesuré directement dans le bécher.

Le contenu du bécher est transvasé quantitativement dans un tube à centrifuger de 40 ml. Après 15 minutes de centrifugation à 4.500 t/min. le surnageant est éliminé par retournement du tube sans entraîner de précipité.

Les parois sont séchées au moyen d'un papier filtre et le précipité est repris par 1 ml (si la prise d'essai de plasma est de 1 ml) de tampon pH 7,6 (R.6).

La dissolution complète est obtenue au moyen d'un agitateur fin au bain-marie à 37°C et au bout de 5 minutes environ.

Détermination du plasminogène

Le plasminogène de la solution d'euglobulines a été dosé par la technique caséïnolytique. Ces euglobulines ont été obtenues à partir de mélanges de plasmas recueillis sur différents anticoagulants :

— Héparine sèche : 1 mg pour 10 ml de sang total

— solution de Wintrobe	{	oxalate d'ammonium	12 g
		oxalate de Potassium	8 g
		eau distillée q. s. p.	100 ml

: 1 ml pour 9 ml de sang total

— solution à 9 g pour 100 ml de citrate trisodique cristallisée avec 5H₂O : 0,5 ml pour 9,5 ml de sang total

suyant l'anticoagulant utilisé nous donnons dans les tableaux sui-

vants les résultats obtenus avec plusieurs mélanges de plasmas. Dans chaque série de déterminations le même mélange de plasma a été utilisé, mais ce sont des mélanges différents qui ont été utilisés d'une série à l'autre et d'un anticoagulant à l'autre.

Pour tous nos tableaux nous avons adopté la légende suivante :

- pH départ = pH du plasma dilué mesuré avant le passage de CO_2
- pH mesuré = pH mesuré immédiatement après le passage de CO_2
- Détermination N° = Déterminations effectuées sur une même série, numérotées en chiffres arabes.
- Durée CO_2 = Durée de passage de courant de CO_2 sur le plasma dilué (en minutes)
- D.O. = Densité optique du filtrat (correspondant à la tyrosine libérée estimée par son absorption spécifique à 275 m μ au spectrophotomètre « MAROC »)
- Unités = résultat exprimé en micromolécules de tyrosine libérées en 1 minute à 37°C à pH 7,8, etc... par 1 litre de plasma.

Variation de l'activité en fonction du pH

TABLEAUX XII à XVI

Anticoagulant utilisé : héparine

TABLEAU XII

pH départ : 7,75 à 21°5

Déterminations N° s	1	2	3	4	5
Durée CO ₂	4	2	1,25	1	0,40
pH mesuré	5,40	5,70	5,85	5,98	6,29
D. O.	0,075	0,086	0,120	0,069	0,080
Unités	53,1	59,8	83,0	51,5	54,8

TABLEAU XIII

pH départ : 7,92 à 16°5

Déterminations N° s	1	2	3	4
Durée CO ₂	4	2	1,15	0,45
pH mesuré	5,33	5,56	5,89	6,16
D. O.	0,102	0,110	0,120	0,105
Unités	73,0	78,0	83	74,6

TABEAU XIV

pH départ : 7,57 à 18°5

Déterminations N° s	1	2	3	4
Durée CO ₂	4	1,10	0,40	0,30
pH. mesuré	5,55	5,85	6,03	6,15
D. O.	0,090	0,100	0,085	0,085
Unités	63,1	68,1	59,8	59,8

TABEAU XV

pH. départ : 7,88 à 22°5

Déterminations N° s	1	2	3	4	5
Durée CO ₂	4	2	1,15	1	0,35
pH. mesuré	5,54	5,63	5,86	5,95	6,25
D. O.	0,105	0,127	0,135	0,105	0,110
Unités	74,6	88	94,6	74,6	78

TABLEAU XVI

pH. départ : 7,71 à 16°5

détermina- tion N° s	1	2	3	4
Durée CO ₂	4	2,30	1,45	1
pH. mesuré	5,30	5,53	5,64	5,85
D.O.	0,090	0,078	0,108	0,114
Unités	61,4	53,1	76,3	79,6

TABLEAU XVII à XVIIIanticoagulant utilisé : solution de Wintrobe**TABLEAU XVII**

pH. départ : 7,86 à 23°5

Détermina- tions N° s	1	2	3	4	5
Durée CO ₂	4	2	1,35	0,55	0,35
pH. mesuré	5,31	5,55	5,80	5,97	6,03
D.O.	0,032	0,060	0,077	0,040	0,050
Unités	24,9	41,5	53,1	28,2	34,8

TABLEAU XVIII

pH. départ : 7,97 à 19°C

Détermination N° s	1	2	3
Durée CO ₂	4	1,10	0,40
pH. mesuré	5,25	5,76	6,02
D.O.	0,080	0,140	0,110
Unités	54,8	98,0	78,0

TABLEAU XIXanticoagulant utilisé : solution de citrate

pH. départ : 8,00 à 16°C

Déterminations N° s	1	2	3	4	5
Durée CO ₂	4	2	1,30	1	0,40
pH. mesuré	5,45	5,70	5,80	6,02	6,33
D.O.	0,055	0,090	0,113	0,050	0,073
Unités	38,2	61,4	78,0	34,9	49,8

DISCUSSION

L'activité caséinolytique du plasminogène des euglobulines précipitées par CO_2 est variable suivant le pH. Ce pH est fonction de la durée de passage du courant gazeux, de sa pression et de son débit.

La pression a été maintenue constante aux environs de 1 bar, quant au débit il a été maintenu constant autant que possible pour une même série de déterminations, mais pas rigoureusement d'une série à l'autre.

Dans ces conditions, en faisant varier uniquement la durée de contact du CO_2 , nous avons pu constater dans toutes nos séries de déterminations et avec les trois anticoagulants que le plasminogène présentait une activité caséinolytique maximale au pH voisin de 5,8.

Il nous semble toutefois difficile sans l'utilisation du pH-mètre d'obtenir ce pH optimal en fixant uniquement la durée de passage de CO_2 et la pression ; car d'une part le débit est difficile à régler, d'autre part le pH de départ n'est pas le même pour les différents plasmas recueillis sur divers anticoagulants.

Les variations de pH de départ se constatent non seulement avec un même plasma recueilli sur divers anticoagulants, mais aussi avec des plasmas différents recueillis avec un même anticoagulant.

Dans les tableaux suivants XX, XXI, nous donnons :

1° — les valeurs de pH de départ de plusieurs séries d'un même plasma recueilli sur trois anticoagulants différents (tableau XX).

2° — les valeurs de pH de départ de plasmas différents recueillis sur un même anticoagulant (XXI).

TABLEAU XX

Variations du pH du plasma en fonction de l'anticoagulant

ANTICOAGULANT		OXALATE	CITRATE	HEPARINE
SERIE	N°			
	1	8,02	7,93	8,09
	2	7,89	8,17	7,96
	3	7,89	8,09	8,07
	4	7,72	7,94	7,84
	5	7,84	7,77	7,74
	6	8,12	8,24	8,20
	7	7,86	7,98	7,94
	8	8,10	8,22	8,23
	9	8,12	—	8,29
	10	7,99	8,18	8,06
	11	7,96	7,90	7,86
	12	7,98	8,14	8,29
	13	7,99	8,12	8,15
	14	7,74	7,68	7,82
	15	7,70	7,91	7,93
	16	8	7,99	7,96
	17	7,93	7,99	8,07
	18	7,97	7,87	7,82
	19	7,92	8,04	7,90
	20	7,74	8,00	7,81

TABLEAU XXI

pl. de plasmas différents prélevés sur le même anticoagulant

P L A S M A S

Anticoa- gulants	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Citrate	7,79	7,90	7,85	8	7,92	8,20	8,14	8,21	8,07	7,92	7,93	7,98	8,04	7,97	8,15
Wintrobe	7,84	8,12	7,86	8,10	8,12	7,99	7,96	7,98	7,99	7,74	7,70	8,10	7,93	7,97	7,92
Héparine	7,74	8,20	7,94	8,23	8,29	8,06	7,86	8,29	8,15	7,82	7,93	7,96	8,07	7,82	7,90

Nous voyons donc que le pH de départ est variable d'un plasma à l'autre même recueilli sur un même anticoagulant (entre 7,79 et 8,20 pour le Citrate, 7,70 et 8,12 pour Wintrobe, 7,74 et 8,29 pour l'Héparine, dans nos exemples).

Ce pH est variable suivant l'anticoagulant utilisé. Mais dans ce cas les variations ne semblent pas provenir de la nature de l'anticoagulant mais plutôt du mode de prélèvement et de la façon dont le plasma a été recueilli.

Quant à la durée de passage du courant de CO_2 nécessaire pour l'obtention d'un pH optimal de $5,8 \pm 0,1$, il nous paraît difficile de la fixer, car comme nous venons de le voir, elle dépend non seulement du pH de départ du plasma dilué, mais aussi du débit de CO_2 dont la pression a été maintenue constante.

Dans le tableau XXII nous donnons les valeurs du pH correspondant à plusieurs plasmas différents (dont les pH de départ variaient de 7,54 à 8,0) après passage d'un courant de CO_2 à débit convenable et pendant le temps nécessaire pour se trouver dans la zone optimale de pH.

Nous remarquons que la durée varie de 1 minute à 1,45 minute ; cette durée n'étant pas la même pour des plasmas ayant le même pH de départ ou de pH très voisins.

Il est donc nécessaire de mesurer pour chaque plasma au pH — mètre, le pH de précipitation des euglobulines afin de se mettre à l'abri des causes d'erreur et d'obtenir le pH donnant le maximum d'activité caséinolytique.

TABLEAU XXII

Relations entre pH du plasma et durée nécessaire de passage du CO₂

PLASMAS N°s	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pH départ	7,75	7,92	7,57	7,88	7,71	7,86	7,97	8,0	7,87	7,54	7,86	7,97	7,72	7,75
Durée CO ₂	1,25	1 15	1,10	1,15	1	1,35	1,10	1,30	1,45	1,30	1,15	1,10	1,20	1,30
pH obtenu	5,85	5,89	5,85	5,86	5,85	5,80	5,76	5,80	5,81	5,78	5,80	5,75	5,79	5,84

**2°/ — Variations de l'activité caséinolytique des euglobulines
obtenues par action de l'acide acétique (NIEWIAROVSK-
KI) en fonction du pH.**

Comme avec le CO_2 nous avons déterminé le pH de précipitation des euglobulines par l'acide acétique, auquel correspond un maximum d'activité caséinolytique, en précipitant les euglobulines de différents mélanges de plasmas normaux à divers pH obtenus au moyen de solutions d'acide acétique de concentrations variables. Le protocole opératoire a été celui préconisé par NIEWIAROVSKI, sauf que l'acide acétique a été utilisé à différentes concentrations pour permettre d'avoir une gamme de pH assez étendue, avec un volume constant.

Le pH a été mesuré immédiatement après agitation pour chaque détermination au moyen du pH-mètre (Radiometer 3).

Dans chaque série d'essais, avant l'addition de l'acide acétique, le pH du plasma dilué dit « pH de départ » a été mesuré.

Le plasminogène de la solution d'euglobulines obtenues à partir de mélanges de plasmas recueillis (sur héparine et wintrobe) a été dosé par la technique caséinolytique (5). Suivant l'anticoagulant utilisé nous donnons dans les tableaux suivants les résultats obtenus avec plusieurs mélanges de plasmas.

Comme pour le CO_2 dans chaque série de déterminations le même mélange de plasmas a été utilisé, mais ce sont des mélanges différents qui ont été utilisés d'une série à l'autre et d'un anticoagulant à l'autre.

Pour tous ces tableaux nous avons adopté la légende suivante :

— pH départ = pH du plasma dilué mesuré avant addition d'acide acétique

- pH mesuré = pH mesuré immédiatement après addition d'acide acétique.
- détermination N° s = Déterminations effectuées sur une même série, numérotées en chiffres arabes.
- Concentration
acide acétique = concentration exprimée en ml d'acide acétique pur pour 100 ml d'eau distillée (0,15 ml de la dilution ont été utilisés dans chaque détermination).
- D.O. { unités } comme dans le CO₂)cf page 93)

Variations de l'activité en fonction du pH

TABLEAUX XXIII à XXV

anticoagulant utilisé : héparine

TABLEAU XXIII pH. départ = 7,84 à 19°C

Déterminations N° s	1	2	3	4	5
Concentration d'acide acétique	2,5	2	1,5	1	0,75
pH. mesuré	5	5,06	5,59	5,83	6,37
D. O.	0,084	0,105	0,101	0,117	0,080
Unités	95,8	73,0	69,7	81,3	54,0

TABLAU XXIV

pH. départ = 7,63 à 18°5

Déterminations N°s	1	2	3	4	5
Concentration acide acétique	2,5	2	1,5	1	0,75
pH. mesuré	4,96	5,17	5,35	5,80	6,30
D. O.	0,107	0,112	0,118	0,121	0,104
Unités	74,6	78,0	81,3	84,7	73,0

TABLAU XXV

pH. départ = 7,85 à 23°5

Déterminations N°	1	2	3	4
Concentration acide acétique	2,5	2	1	0,5
pH. mesuré	4,9	5,20	5,85	6,82
D. O.	0,140	0,143	0,148	0,099
Unités	97,9	99,6	102,9	68,1

TABLEAU XXVII à XXVIIanticoagulant utilisé : Wintrobe**TABLEAU XXVI**

pH. départ : 7,89 à 23°5

Déterminations N° s	1	2	3	4	5	6
Concentration acide acétique	2,5	2	1,5	1	0,75	0,5
pH. mesuré	4,92	5,03	5,34	5,83	6,51	6,71
D. O.	0,085	0,090	0,095	0,127	0,060	0,050
Unités	59,8	63,1	66,4	89,6	41,5	63,5

TABLEAU XXVII

pH. départ : 7,86 à 23°5

Déterminations N° s	1	2	3	4
Concentration acide acétique	2	1	0,75	0,5
pH. mesuré	5,26	5,82	6,33	6,62
D.O.	0,055	0,090	0,080	0,035
Unités	38,2	61,4	54,8	26,5

TABLEAU XXVIII

pH. départ — 7,77 à 19°C

Déterminations N°	1	2	3
Concentration acide acétique	1,5	1	0,75
pH. mesuré	5,11	5,73	6,11
D. O.	0,130	0,155	0,150
Unités	93,0	107,9	104,6

DISCUSSIONS

Comme pour le C02, nous constatons que le pH de précipitation des euglobulines par l'acide acétique auquel correspond le maximum d'activité du plasminogène est au voisinage de : 5,80 $\pm$ 0,1.

Il est facile de réaliser ce pH en déterminant la quantité d'acide acétique à ajouter.

L'expérience montre que l'addition de 0,15 ml d'acide acétique (à 1 pour 100) préconisé par NIEWIAROVSKI donne un pH voisin de ce pH optimum ; reste à savoir si la quantité de 0,15 ml standardisée par l'auteur dans la technique est suffisante pour l'obtention de ce pH optimum avec divers plasmas ayant des pH de départ différents.

Au cours de nos essais, nous avons pu nous rendre compte que la quantité d'acide préconisée par l'auteur ne permettait pas toujours d'obtenir le pH optimal.

Dans le tableau suivant (XXIX), nous donnons les valeurs de pH obtenues avec plusieurs plasmas différents à des pH de départ variés, acidifiés par la même quantité d'acide acétique (0,15 ml CH₃COOH à 1 %)

TABLEAU XXIX

Plasmas N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH. départ	8,08	7,95	7,86	7,57	7,90	7,63	7,84	7,54	7,72	7,81
pH. obtenu	6,0	5,92	5,83	5,73	5,88	5,80	5,83	5,65	5,78	5,82

le pH final varie donc de 5,65 à 6,0 ce qui correspond à peu près à la zone optimale mais il y a intérêt à ajuster le pH de façon plus précise (cf page 109)

Nous avons pu dans toutes nos expériences ajuster de façon rigoureuse ce pH, en ajoutant une quantité d'acide acétique à 1 % légèrement variable suivant le pH de départ ; cette quantité varie de 0,15 ml à 0,17 ml

généralement $\left\{ \begin{array}{l} 0,15 \text{ ml pour des pH variant de } 7,70 \text{ à } 7,80 \\ 0,16 \text{ ml pour des pH variant de } 7,80 \text{ à } 7,95 \\ 0,17 \text{ ml pour des pH variant de } 7,95 \text{ à } 8,10 \end{array} \right.$

Dans le tableau XXX nous indiquons les quantités d'acide acétique à 1%, ajoutées à différents plasmas ayant des pH de départ variés, nécessaires pour l'obtention du pH optimum pour la précipitation des euglobulines (ce pH est de 5,8 $\pm$ 0,1)

TABLEAU XXX

Quantité de solution d'acide acétique nécessaire

PLASMAS N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
pH départ	7,70	7,72	7,81	7,86	7,84	7,92	7,70	7,95	7,99	8,05	8,08	7,92	8,01	7,97	8,04
Acide acétique à 1 % (ml)	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,17	0,15	0,16	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,16	0,17
pH obtenu	5,80	5,82	5,86	5,80	5,85	5,79	5,76	5,85	5,80	5,85	5,85	5,86	5,80	5,86	5,83

Il nous paraît donc nécessaire de bien ajuster la quantité d'acide acétique ajoutée pour se trouver dans les bonnes conditions de précipitation.

3° — Etude du mûrissement du précipité d'euglobulines

Alors que VON KAULLA, considère que la précipitation des euglobulines est complète immédiatement après le passage du courant convenable de CO_2 , dans la technique à l'acide acétique, afin d'obtenir une précipitation complète, NIEWIAROVSKI préconise d'abandonner le plasma acidifié 30 minutes à $+ 4^\circ$.

Il nous a semblé donc utile d'étudier l'influence de ce mûrissement du précipité à $+ 4^\circ$ sur son activité caséinolytique.

Partant d'un même mélange de plasmas recueillis sur héparine, nous avons précipité les euglobulines après acidification par l'acide acétique à un pH voisin de 5,80.

Nous avons effectué des déterminations parallèles de l'activité caséinolytique du plasminogène des :

- euglobulines précipitées et immédiatement centrifugées.
- euglobulines précipitées, abandonnées 30 minutes à $+ 4^\circ$, avant centrifugation.

Dans le tableau (XXXI) nous indiquons les résultats de l'activité caséinolytique exprimée en unités (U.) obtenus dans les deux séries parallèles de déterminations numérotées (1 à 5 pour la série où les euglobulines ont été abandonnées 30 minutes à $+ 4^\circ$, 1' à 5' où les euglobulines ont été centrifugées immédiatement)

Notons que dans chaque série, les 5 déterminations ont été faites parallèlement.

LEGENDE :

Le « pH obtenu » indique le pH de précipitation des euglobulines mesuré immédiatement après addition d'acide acétique .

D. O. indiquant la densité optique, le pH de départ est le même pour toutes les déterminations.

TABLEAU XXXI

Etude du mûrissement du précipité

Euglobulines centrifugées immédiatement						Séjour euglobulines 30 minutes à + 4° avant centrifugation					
Déterminations N°	pH départ	pH obtenu	D. O.	Unités		Déterminations N°	pH départ	pH obtenu	D. O.	Unités	
1'	7,84	5,80	0,049	38,2		1	7,84	5,75	0,064	49,8	
2'	«	5,75	0,051	39,8		2	«	5,75	0,079	56,5	
3'	«	5,76	0,050	38,2		3	«	5,80	0,072	53,1	
4'	«	5,76	0,046	36,5		4	»	5,76	0,077	54,8	
5'	»	5,80	0,043	33,2		5	»	5,80	0,087	61,4	
Moyenne DO = 0,048 + 0,004						Moyenne DO = 0,076 + 0,012					
Moyenne unités = 37,2 + 3,3						Moyenne unités = 55,2 + 5,8					

Nous constatons donc une diminution de l'activité du précipité d'euglobulines n'ayant pas séjourné 30 minutes à + 4°, cette diminution est de l'ordre de 30 % par rapport à l'activité du précipité des euglobulines ayant subi cette attente à basse température.

Il semble donc que la précipitation des euglobulines ne se fait pas complètement au moment de l'acidification par l'acide acétique, et que le « mûrissement » à + 4° du précipité est nécessaire pour une précipitation complète correspondant à un maximum d'activité.

Par contre divers essais effectués avec 1 CO₂ comme mode d'acidification n'ont pas montré une augmentation d'activité après attente de 30 minutes à + 4° pour séparer le précipité.

4° — Conclusions

BLIX (S) (20) a étudié en fonction du pH la précipitation des euglobulines par l'acide acétique suivant la technique de NIEWIAROVSKI. Il a trouvé que le précipité obtenu à pH 6,4 possédait un maximum d'activité lytique, alors que la concentration en plasminogène était maxima à pH 5,2 et celle en fibrinogène à pH 5,8.

VON KAULLA (109) employant le CO₂ avait par contre trouvé une activité lytique maxima du précipité d'euglobulines à pH 5,2.

NIEWIAROVSKI (84) a d'autre part montré que la lyse du caillot obtenu par action de la thrombine sur la solution des euglobulines précipitées ne dépendait pas du taux de fibrinogène contenu dans les euglobulines. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'en utilisant la technique indiquée :

1° — le maximum d'activité caséinolytique du précipité d'eu-

globulines était obtenu pour un pH de $5,8 \pm 0,1$ quelque soit le mode d'acidification utilisé (CO_2 ou acide acétique).

2° — il est nécessaire d'attendre au moins 30 minutes à + 4° après acidification par l'acide acétique avant de recueillir le précipité pour obtenir le maximum d'activité caséinolytique, alors qu'en utilisant le CO_2 , l'activité maximum peut être obtenue en recueillant le précipité immédiatement.

3° — L'ajustage précis du pH de précipitation dans la zone optimale est indispensable. L'emploi de conditions standards pour tous les plasmas n'est pas valable : Il est nécessaire d'ajuster la durée de passage de CO_2 ou la quantité d'acide acétique en contrôlant le pH au pH-mètre.

II — REPRODUCTIBILITE DE LA TECHNIQUE

CASEINOLYTIQUE

Pour poursuivre cette étude nous avons évalué l'erreur expérimentale pouvant être commise dans le dosage en étudiant la reproductibilité de la technique.

Nous avons vu lors de l'établissement de la courbe d'étalonnage pour la technique, que le spectrophotomètre mesurant la densité optique de la tyrosine manquait de fidélité pour les valeurs basses (10 à 20 mcg).

A cette cause d'erreur d'ordre matériel s'en ajoute une autre d'ordre expérimental due aux imprécisions des différents actes opératoires.

Dans les tableaux XXXII, XXXIII, XXXIV, nous donnons les résultats exprimés en unités, obtenus, dans trois séries de déterminations. Dans chaque série, les déterminations ont été effectuées parallèlement avec des euglobulines précipitées au même pH (voisin de 5,8) soit avec l'acide acétique, soit avec le CO_2 , à partir du même mélange de plasma (mais des mélanges différents ont été utilisés d'une série à l'autre).

pH = pH de précipitation des euglobulines par CO_2 ou l'acide acétique.

DO = densité optique des filtrats

TABLEAU XXXII

Euglobulines précipitées par l'acide acétique

Déterminations N°	1	2	3	4	5
pH.	5,86	5,85	5,82	5,85	5,80
D. O.	0,080	0,090	0,077	0,084	0,080
Unités	54,8	61,4	53,1	59,8	54,8
Moyenne D. O.	0,082	+	0,008		
Moyenne unités	57	+	4,1		
Erreur absolue	- 0,002	+	0,008	+	0,002 - 0,002
L'erreur relative maximale	= 0,008 x 100 = 10,4 %				

TABLEAU XXXIII

Euglobulines précipitées par l'acide acétique

Déterminations N°	1	2	3	4	5	6	7
pH.	5,82	5,76	5,83	5,77	5,87	5,81	5,82
D. O.	0,113	0,114	0,126	0,119	0,115	0,115	0,114
Unités	79,6	81,3	89,5	84,7	81,3	81,3	81,3
Moyenne D. O.	0,117	+	0,007				
Moyenn Unités	84,4	+	5				
Erreur absolue	- 0,004	- 0,003	+	0,009	+	0,002 - 0,002	- 0,002
L'erreur relative maximale	= $\frac{0,009}{0,113}$ x 100 = 8 %						

TABLEAU XXXIV

Euglobulines précipitées par CO₂

Déterminations N°	1	2	3	4	5	6	7	8
pH.	5,78	5,81	5,79	5,74	5,82	5,80	5,81	5,79
D. O.	0,121	0,129	0,109	1,110	0,107	0,127	0,126	0,115
Unités	86,3	93,0	78,0	78,0	76,3	91,3	89,6	81,3

Moyenne D O 0,118 + 0,02

Moyenne unités 84,2 + 8,2

Erreur absolue + 0,003 - 0,011 - 0,009 - 0,008 - 0,001 +
0,009 + 0,008 - 0,003

l'erreur relative maximale = $\frac{0,011}{0,107} \times 100 = 10,3 \%$

Nous estimons donc à 10 % environ l'erreur relative maximale pouvant être commise dans la technique.

III — Comparaison de l'activité caséinolytique des euglobulines obtenues par les deux modes d'acidification (CO₂ ou acide acétique)

Ayant étudié la reproductibilité de la technique caséinolytique, et fixé, le pH optimal de précipitation des euglobulines dans les techniques d'acidification, nous avons voulu comparer l'activité des euglobulines précipitées par les deux modes d'acidification à ce même pH optimum: 5,8 + 0,1.

Deux séries de déterminations parallèles ont donc été effectuées sur le même mélange de plasmas recueillis sur héparine.

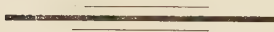
Pour l'obtention du pH optimum de précipitation des euglobulines :

- le courant de CO_2 a été réglé à une pression de 1 bar et un débit convenable identique pour toutes les déterminations, la durée de passage étant de 1,30 minute pour chaque détermination.
- La quantité d'acide acétique à 1 % ajoutée était de 0,16 ml
Le pH de départ du mélange de plasma dilué étant de 7,85.

Le tableau XXXV, groupe les résultats obtenus exprimés en unités dans les deux séries de déterminations.

Le pH obtenu = pH mesuré après acidification.

D O = densité optique des filtrats.



TABEAU XXXV

Comparaison des résultats obtenus avec les deux modes d'acidification

Courant de CO ₂				Acide acétique			
Déterminations N°	pH obtenu	D. O.	Unités	Déterminations N°	pH obtenu	D. O.	Unités
1	5,78	0,121	86,3	1'	5,82	0,113	71,6
2	5,81	0,129	93,0	2'	5,76	0,114	81,3
3	5,79	0,109	78,0	3'	5,83	0,126	91,3
4	5,74	0,110	78,0	4'	5,77	0,119	84,7
5	5,82	0,107	76,3	5'	5,85	0,115	81,3
6	5,80	0,127	91,3	6'	5,81	0,115	81,3
7	5,81	0,126	89,6	7'	5,82	0,114	81,3
Moyenne DO = 0,118 + 0,018				Moyenne DO = 0,117 + 0,009			
Moyenne unités = 84,3 + 8,2				Moyenne unités = 83 + 5,7			

CONCLUSIONS. — Quelle que soit la source d'acidification (CO_2 ou acide acétique), pourvu que les euglobulines soient précipitées au même pH, leur solution a pratiquement la même activité caséinolytique. La différence des moyennes des Unités trouvées est inférieure à 1 %.



IV — Influence de l'anticoagulant utilisé sur l'activité caséïnolytique du précipité d'euglobulines.

BUCKELL (M) (23) étudiant la lyse du caillot des euglobulines par la technique de VON KAULLA (108), attribue à la solution de citrate utilisé comme anticoagulant un effet inhibiteur, et préconise l'utilisation du mélange de Wintrobe.

D'autres auteurs ont étudié les effets des anticoagulants en particulier de l'héparine sur l'activité fibrinolytique du plasma et des euglobulines, estimée par la méthode des plateaux (cf page 135).

Dans le cadre de nos recherches, nous avons étudié les effets des trois anticoagulants couramment utilisés (mélange de Wintrobe en solution, solution de citrate, héparine sèche) sur l'activité caséïnolytique du précipité d'euglobulines.

Pour cela un même plasma a été recueilli parallèlement sur les trois anticoagulants.

Etant donné les modes de prélèvements utilisés (cf page: 92), les plasmas héparinés ne sont pas dilués alors que, avec une approximation suffisante, nous pouvons admettre que les plasmas prélevés sur mélange de Wintrobe ont été dilués de 20% (1 ml pour 9 ml de sang total, soit 5 ml de plasma), et ceux sur citrate de 10% (0,5 ml pour 9,5 ml de sang total soit 5 ml de plasma).

Dans le table au XXXVI nous avons donc calculé les valeurs corrigées correspondantes, tenant compte de ces dilutions, les résultats étant exprimés en Unités.

TABLEAU XXXVI

Comparaison de l'activité caséinolytique des précipités d'euglobulines obtenus avec des plasmas recueillis sur divers anticoagulants

Anti-coagulant		W I N T R O B E		C I T R A T E		HEPARINE
Plasmas	N°	Valeur trouvée	Valeur corrigée	Valeur trouvée	Valeur corrigée	valeur trouvée
	1	88,0	104,6	93,0	101,2	89,6
	2	89,6	106,2	79,6	88,0	83,0
	3	107,9	117,9	117,9	129,5	126,1
	4	107,9	117,9	102,9	112,9	107,9
	5	93,0	111,2	93,0	101,3	94,6
	6	104,6	124,5	102,9	112,9	104,6
	7	134,5	159,4	136,1	149,4	136,1
	8	107,9	117,9	119,5	131,1	106,2
	9	121,2	144,5	124,5	136,1	126,1
	10	124,5	147,7	124,5	136,1	129,5
	11	81,3	96,3	91,3	99,6	88,0
	12	101,3	121,2	99,6	109,6	124,5
	13	119,5	142,8	116,2	127,8	126,1
	14	71,3	84,6	68,1	74,6	91,3
	15	103,0	122,8	122,8	134,4	122,8
	16	88,0	104,6	83,0	91,3	94,6
	17	136,1	162,7	136,1	149,4	136,1
	18	111,2	132,8	137,8	151,1	129,5
	19	121,2	144,4	107,9	117,9	109,6
	20	49,8	59,8	53,1	58,1	63,1

Anti-coagulant		W I N T R O B E		C I T R A T E		HEPARINE
Plasmas	N°	Valeur trouvée	Valeur corrigée	Valeur trouvée	Valeur corrigée	Valeur trouvée
	21	109,6	131,1	134,5	147,7	137,8
	22	107,9	129,5	124,5	136,1	124,5
	23	124,5	147,7	124,5	136,1	124,5
	24	88,0	104,6	91,3	99,6	88,0
	25	88,0	104,6	91,3	99,6	88,0
	26	124,5	147,7	124,5	136,1	124,5
	27	96,3	114,5	101,3	111,2	102,9
	28	54,8	64,7	56,4	61,4	56,4
	29	66,4	79,6	88,0	96,3	79,6
	30	79,6	94,6	85,3	94,6	116,2
	31	71,3	84,7	66,4	73,0	71,3
	32	86,3	102,9	84,7	93,0	79,6
	33	121,2	144,4	93,0	101,3	116,2
	34	126,2	151,1	127,8	139,4	126,2
	35	99,6	119,5	99,6	109,6	109,6
	36	88,0	104,6	99,6	109,6	119,5
	37	83,9	99,6	66,4	73,0	69,7

Valeurs moyennes $\frac{3677}{37} = 99,4$ $\frac{4515}{37} = 122$ $\frac{3768}{37} = 101,8$ $\frac{4117}{37} = 111,2$ $\frac{3926}{37} = 106,$

D I S C U S S I O N

L'examen des résultats montre qu'il existe peu de différences entre les résultats trouvés avec les différents anticoagulants et que l'emploi de l'un quelconque d'entre eux ne modifie pas l'interprétation clinique. Les résultats sont souvent dans les limites de reproductibilité de la méthode et leurs variations ne sont pas toujours dans le même sens suivant l'anticoagulant utilisé. Toutefois statistiquement il semble qu'il y ait une activité légèrement plus faible lorsqu'on utilise l'héparine et légèrement plus forte quand on utilise le mélange de Wintrobe, par rapport à l'activité des plasmas citratés pris comme référence.

V — ETUDE DE LA CONSERVATION ET DE LA CONGELATION

La conservation du plasma à la température du laboratoire ou à $+ 4^{\circ}$ étant mauvaise d'après les données bibliographiques, nous avons étudié la conservation après congélation à $- 20^{\circ}\text{C}$ et décongélation à la température du laboratoire. Nous avons constaté au cours des différentes déterminations:

1° — que le plasma décongelé présentait un aspect trouble dû à un précipité formé au cours de la congélation.

2° — que le «pH de départ» du plasma augmentait au cours de la conservation à -20°C . Nous groupons dans le tableau XXXVII les «pH de départ» de plusieurs mélanges de plasmas mesurés à l'état frais et après conservation pendant des temps différents.

TABLEAU XXXVII

Plasmas N°	pH. D E D E P A R T			
	Frais	CONSERVATION à -20°C		
		24 h.	48 h.	72 h.
1	7,75	7,88	7,95	8,21
2	7,70	7,83	7,92	
3	7,54	7,87	7,95	
4	7,63	7,84	—	
5	7,69	7,86	7,97	
6	7,71	7,92	—	
7	7,72	7,81	—	
8	7,57	7,86	—	
9	7,75	—	7,88	
10	7,81	—	8,17	
11	7,84	—	7,94	
12	7,90	8,0	8,12	
13	7,78	7,86	7,93	

cette variation du «pH de départ» au cours de la conservation entraîne donc comme nous l'avons démontré, des variations dans les quantités de CO_2 , d'acide acétique nécessaires pour l'obtention du pH optimum de précipitation des euglobulines.

3° — que la solubilisation du précipité des euglobulines dans le tampon pH 7,6 devient de plus en plus difficile à mesurer que la durée de conservation du plasma augmente. Il est donc nécessaire de prolonger l'agitation au bain-marie à 37°C pour dissoudre complètement le précipité.

4° — que les résultats obtenus pour la mesure de l'activité caséinolytique du précipité d'euglobulines provenant d'un plasma congelé, comparés à celle des euglobulines du même plasma frais ne varient pas de la même manière suivant les plasmas.

Nous avons constaté en effet parfois une augmentation plus ou moins nette de cette activité au cours de la conservation, parfois une stabilité.

D I S C U S S I O N

Il est donc nécessaire d'opérer les déterminations cliniques sur plasmas frais.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons précisé les détails techniques dont l'observation est indispensable pour obtenir une bonne précision.

Nous avons montré en particulier qu'il fallait ajuster le pH à une valeur précise de $5,8 \pm 0,1$ pour chaque plasma afin d'obtenir le maximum d'activité caséïnolytique dans le précipité d'euglobulines.

La technique que nous avons utilisée ne nous semble pas pouvoir être considérée comme une méthode de dosage du plasminogène proprement dit.

Nous proposons donc de la considérer comme une « mesure d'activité caséïnolytique du précipité d'euglobulines ».

Il semble que dans le précipité d'euglobulines existe à côté du plasminogène et des autres corps connus (fibrinogène, facteurs antihémophiliques A et B, facteur VII), au moins un inhibiteur.

Les résultats obtenus par cette méthode semblent cependant avoir une signification clinique puisque l'on peut constater des variations pathologiques et physiologiques marquées comme nous le verrons plus loin. Mais nous ne pensons pas que l'on puisse établir une correspondance entre les résultats et le seul plasminogène contenu dans le plasma des malades.

En application des résultats que nous avons obtenus nous proposons la technique ci-dessous que nous avons suivie strictement dans nos essais cliniques.

TECHNIQUE DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE

CASEINOLYTIQUE DES EUGLOBULINES

(plasminogène)

Prélèvement

— Recueillir 10 ml de sang total prélevé par ponction veineuse au pli du coude sur 1 mg d'héparine sèche dans un tube à centrifuger plastique jaugé. Dissoudre aussitôt l'héparine en retournant doucement et à plusieurs reprises le tube bouché.

— ou bien

9 ml de sang total sur 1 ml de solution de Wintrobe (cf page 92), mélanger aussitôt par retournement du tube bouché.

— ou bien

9,5 ml de sang total sur 0,5 ml de solution de citrate trisodique cristallisée avec 5,5 OH₂ à 9 g pour 100 ml, mélanger aussitôt par retournement du tube bouché.

REACTIFS et MATERIELS (cf page 78)

TECHNIQUE

- centrifuger aussitôt le sang pendant 15 minutes à 4.500 tours/min.
- Décanter le plasma surnageant, le conserver à 0°C dans la glace fondante, ou à + 4° jusqu'au moment du dosage qu'il faut effectuer dans les heures qui suivent le prélèvement.
- dans un bécher de 50 ml contenant 15 ml d'eau distillée, ajouter 1 ml de plasma, mélanger.

- mesurer avec un pH-mètre Radiometer 3 le pH «dit de départ» de la dilution de plasma et maintenir le bécher en position de mesure continue.
- précipiter les euglobulines
 - a) soit par un courant de CO_2 sous pression d'environ 1 bar obtenu à partir d'une bouteille de CO_2 comprimé et d'un double détendeur «Cahomet»,
un «réchauffeur» électrique branché sur le détendeur, ou à défaut un chiffon imbibé d'eau bouillante, permet d'éviter la formation de givre dans les détendeurs, ce qui risque de causer des variations et des sauts dans le débit gazeux.
 - Faire arriver le courant de CO_2 dans le bécher à environ 5 à 10 mm au-dessus du niveau du mélange au moyen d'un raccord en caoutchouc terminé par une pipette pasteur.
 - (le courant de CO_2 agite suffisamment le mélange pour homogénéiser le tout).
 - maintenir le courant de CO_2 pendant environ 2 minutes jusqu'à obtenir un pH voisin de 5,8 (+ 0,10).
 - Transvaser quantitativement le mélange dans un tube à centrifuger conique de 45 ml en prenant les précautions nécessaires pour bien entraîner la totalité des protéines précipitées.
 - centrifuger aussitôt 10 minutes à 4.500 tours/min.
 - b) soit en ajoutant goutte à goutte et en agitant 0,15 ml de solution d'acide acétique à 1 pour 100 ml.
- mesurer le pH obtenu et l'ajuster vers 5,8 (+ 0,10) en

ajoutant si nécessaire un peu de solution d'acide acétique à 1 % jusque 0,05 ml (en général cette quantité est fonction du pH de départ):

$$\left\{ \begin{array}{l} 0,15 \text{ ml pour pH } 7,70 \text{ à } 7,80 \\ 0,16 \text{ ml pour pH } 7,80 \text{ à } 7,95 \\ 0,17 \text{ ml pour pH } 7,95 \text{ à } 8,10 \end{array} \right.$$

- Agiter et transvaser quantitativement dans un tube à centrifuger conique de 45 ml.
- laisser au repos à + 4° le mélange pendant 25 — 30 minutes.
- centrifuger 10 minutes à 4.500 tours/min.
- Rejeter le surnageant avec précaution pour ne pas entraîner de précipité et égoutter complètement le tube en le retournant sur un papier filtre, puis essuyer avec un tortillon de papier filtre les parois du tube avec précautions pour enlever tout le liquide qui peut y rester.
- Ajouter dans le tube 1 ml de tampon pH 7,6, porter au bain-marie à 37° et agiter avec un agitateur fin en verre pour dissoudre tout le précipité (5 minutes suffisent en général pour les plasmas frais, mais il faut prolonger un peu le temps pour obtenir une dissolution satisfaisante dans le cas de plasmas conservés).
- Dès la fin de la dissolution, transporter 0,25 ml de la solution d'euglobulines dans un tube à essai contenant :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{solution tampon pH } 8,0 \text{ (R } 5) \text{ } 2,5 \text{ ml} \\ \text{solution caséine (R6) } 3 \text{ ml,} \end{array} \right.$$

préparé pendant la centrifugation et préchauffé à 37°C
Mélanger.

— Ajouter ensuite 0,25 ml de solution de streptokinase (SK) à 2000 U. /ml (R 4).

— Agiter aussitôt et prélever 2 ml que l'on porte dans un tube à hémolyse à centrifuger contenant 3 ml de solution d'acide trichloracétique à 10%.

Ce tube qui servira de témoin, est laissé après agitation 30 minutes à la température du laboratoire puis centrifugé pendant 10 minutes à 4.500 tours/min.

— Filtrer sur un peu de coton de verre hyperfin lavé au préalable et séché (cf page 81), enfoncé légèrement dans la tige d'un petit entonnoir.

— Recueillir le filtrat qui doit être très limpide, (si non ! centrifuger ou le filtrer à nouveau) pour la lecture ultérieure de l'absorption de base.

— Par contre, laisser incuber le tube contenant le reste du mélange pendant exactement 60 minutes au bain-marie à 37° après l'avoir bouché.

— Prélever 2 ml du mélange que l'on verse dans un tube à hémolyse à centrifuger contenant 3 ml d'acide trichloracétique à 10%.

— Laisser 30 minutes à la température du laboratoire, puis opérer comme pour le témoin, afin d'obtenir un filtrat parfaitement limpide.

— Lire l'absorption dans les heures qui suivent avec un spectrophotomètre à bande étroite «MAROC» à 275 m μ en cuves de quartz, les filtrats correspondant au témoin et au dosage.

ETALONNAGE

1° — A partir d'une solution mère de tyrosine à 500 mcg pour 3 ml dans une solution d'acide trichloracétique à 10 pour 100 ml; préparer extemporanément les dilutions suivantes :

tubes	1	2	3	4	5	6
solution de tyrosine à 500 mcg/3ml	0	0,5	1	2	4	10 ml
solution d'acide trichloracétique à 20 % pure	10	9,5	9	8	6	0 ml

Préparer un mélange contenant :

tous les réactifs utilisés pour le dosage et dans les mêmes proportions, sauf le plasma qui est remplacé par du soluté physiologique de chlorure de sodium à 9 g pour 1000 ml.

solution de caséine (R. 6) 12 ml

solution tampon phosphate (R. 5) 10 ml

soluté physiologique Na cl 9 o/oo (R. 8) 1 ml

solution de streptokinase (R. 4) 1 ml

3° — Répartir rapidement 2 ml de ce mélange dans 10 tubes à hémolyse renfermant 2 par 2, 3 ml de chacune des dilutions de tyrosine précédentes suivant le tableau ci-dessous :

TABLEAU XXXVIII

Tubes	1 1 bis	2 2 bis	3 3 bis	4 4 bis	5 5 bis
dilution					
Tyrosine	3 ml (1)	3 ml (2)	3 ml (3)	3 ml (4)	3 ml (5)
Mélange	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
tyrosine contenue dans l'es- sai (mcg/3 ml)	0 mcg	25 mcg	50 mcg	100 mcg	200 mcg

4° — Agiter les tubes, laisser 30 minutes à la température du laboratoire, puis centrifuger, filtrer et opérer comme dans la technique du dosage.

5° — Lire l'absorption au spectrophotomètre MAROC en U.V. à 275 m μ en cuves de quartz, en effectuant le zéro sur la solution d'acide trichloracétique à 10 pour 100 ml pure.

C A L C U L S

- 1 — déduire la densité optique du témoin de celle du dosage.
- 2 — se reporter à une courbe d'étalonnage préparée suivant les indications ci-dessus pour connaître la quantité de tyrosine libérée dans l'essai.
soit X cette quantité exprimée en mcg.
- 3 — Transformer le résultat en Unités (micromolécules de Tyrosine libérées par minute par un litre de plasma dans les

conditions opératoires strictes que nous avons suivies).

en effectuant le calcul suivant :

$$\frac{X \times 12 \times 100}{181 \times 60} = X \times 1,10$$

puisque la quantité libérée dans chaque essai correspond à
0,25 ml de plasma.
3



APPRECIATION SEMI-QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE

FIBRINOLYTIQUE

— TECHNIQUE DES PLATEAUX DE FIBRINE D'APRES

ASTRUP, MULLERTZ (9), LASSEN (63)

INTRODUCTION

Partant des données bibliographiques, nous avons étudié et discuté les différents facteurs pouvant intervenir sur les résultats obtenus.

1 — Principe.

Le dépôt à la surface d'un gel de fibrine d'une goutte de plasma pathologique ou d'une solution des euglobulines qui en dérivent, additionnée ou non d'effecteurs (streptokinase, urokinase, permet sur un même plateau (chauffé ou non chauffé), l'estimation grossière du taux des inhibiteurs, des activateurs, du plasminogène et de la plasmine libre.

ETUDE CRITIQUE DES REACTIFS ET MATERIELS

1 — Tampon phosphate 0,03 M pH = 7,3

{	Po4 H ₂ Na	1,45 g
	Po4 H Na ₂ , 12 H ₂ O	8,95 g
	Eau distillée q.s.p.	1500 ml

- 2 — solution de streptokinase (SK) (1) à 1000 U. CHRISTENSEN par ml dans du tampon phosphate pH 7,3. Cette solution congelée par petites fractions à — 20°C peut se conserver 4 à 5 jours. On utilise ultérieurement 0,05 ml de cette solution (soit

50 unités) qui ajoutée à 0,2 ml de plasma, donnera une concentration finale de 200 U. de SK par ml de plasma dilué.

- 3 — UROKINASE (UK) (1), 500 unités PLOUG par flacon : Dissoute dans 10 ml de tampon phosphate pH 7,3 donne une solution à 50 unités PLOUG par ml pouvant se conserver congelée à -20°C par petites fractions de 1 ml, servant à préparer extemporanément les solutions filles à 10 unités par ml de tampon utilisées dans la technique.
- 4 — Alpha Chymotrypsine (1), 25 unités C. Hb ou 418 Unités A.E. (Codex) par flacon: Dissoute dans 5 ml de tampon phosphate pH 7,3 donne une solution à 5 unités C. Hb par ml ou 83,6 Unités A.E., pouvant se conserver congelée à -20°C par fractions de 1 ml servant pour la préparation extemporanée de solutions filles.
- 5 — Trypsine (1) 250.000 Unités S.T. ou 925 Unités A.E. (Codex) par flacon : Dissoute dans 10 ml de tampon phosphate pH 7,3 pouvant se conserver congelée à -20°C par petites fractions de 1 ml. servant à préparer extemporanément des solutions filles.
- 6 — Plaques «Standard» de fibrine ou plateaux non chauffés (9)
— Dans une boîte de Pétri à fond extra plat de 10 cm. de diamètre, verser 15 ml d'une solution de fibrinogène bovin.

(«POVIET Producteur N.V. AMSTERDAM» lot N° 47

teneur en protéïnes	76,4 %
teneur en fibrinogène coagulable	69,9 %
teneur de Na cl	18,4 %

(1) Produits qui nous été fournis gracieusement par les Laboratoires CHOAY que nous remercions vivement

Fibrinogène bovin (fraction I de COHN)	0,5 g
Merthiolate (conservateur)	0,01 g
Solution tampon phosphate pH 7,3.....	100 ml

L'adjonction de merthiolate a le double avantage d'empêcher la contamination bactérienne et d'opacifier le gel (22 Bis), ce qui rend plus évidente la zone de lyse. La solution de fibrinogène se prépare facilement au bain-marie à 37°C pendant 10 à 15 minutes dans un erlenmeyer en agitant de temps en temps.

Une filtration sur tampon de coton hydrophile est recommandée pour se débarrasser de la mousse qui se forme au cours de la dissolution, et avoir un gel de fibrine homogène.

— Ajouter goutte à goutte dans la boîte 0,2 ml de solution de thrombine à 20 Unités Mellanby par ml. (1 ampoule de thrombine ROUSSEL à 100 Unité Mellanby est reconstituée avec 5 ml de soluté physiologique de ClNa à 9 g o/oo).

L'addition de la thrombine (avec la main droite) doit être accompagnée d'une agitation circulaire assez forte (avec la main gauche) de la boîte maintenue bien à plat et à l'horizontale sur la paillasse.

— Laisser au repos 10 à 15 minutes pour obtenir un coagulum homogène et uniforme de 4 à 5 mm. d'épaisseur.

N.B. — Les plateaux dits «Standards» contiennent une quantité importante de plasminogène bovin qui accompagne toujours les préparations de fibrinogène; par contre ils sont dépourvus de proactivateur.

Ce substrat est donc sensible à tout matériel apportant un activateur direct du plasminogène bovin (U.K.), par contre il est indispensable à la streptokinase en absence de plasma humain. Si

celui-ci apporte un peu de proactivateur sur lequel la streptokinase agit pour donner un activateur direct du plasminogène bovin, il y a formation de plasmine bovine.

CHAUFFAGE DES PLATEAUX

7 — Plaques de fibrine «chauffées ou Plateaux chauffés (63).

Préparer des plaques de la même manière que précédemment, puis les porter pendant 45 minutes à 80°C en atmosphère humide (placer au préalable dans l'étuve à 80°C un grand béccher d'eau distillée pour que l'atmosphère de l'étuve soit saturée de vapeurs d'eau).

Le plasminogène thermolabile est détruit dans ces conditions.

Le chauffage proposé par LASSEN (63) a été repris par différents auteurs; mais ces auteurs utilisent des réactifs fibrinogènes différents, de pureté variable et à des concentrations également souvent variables.

La durée de chauffage nécessaire est par conséquent variable et la standardisation est difficile. En effet les données trouvées dans la littérature appliquées directement ne nous ont pas donné satisfaction.

Avec nos réactifs nous avons donc déterminé les conditions de chauffage nécessaires pour la destruction complète du plasminogène avec altération minimum des propriétés du substrat.

Cette destruction a été contrôlée au moyen de l'Urokinase (UK) qui agit directement sur le plasminogène et le transforme en plasmine douée d'activité fibrinolytique.

Dans nos essais nous avons utilisé plusieurs plateaux préparés avec le même lot de fibrinogène chauffés à 80° en atmosphère hu-

mide, avec des durées de chauffage différentes.

Les plateaux refroidis ont été ensemencés 3 par 3 suivant la durée de chauffage avec une solution d'urokinase à 10 Unités Ploug par ml de tampon phosphate pH 7,3, chaque plateau a été ensemencé en 4 points avec 30 m m3 de la solution d'urokinase pour chaque point.

Les zones de Lyse exprimées en mm2 ont été lues après incubation des plateaux à 37°C durant des intervalles de temps différents.

Nous indiquons dans le tableau XXXIX les valeurs trouvées pour les zones de Lyse en fonction de la durée de chauffage et des intervalles de temps de lecture.

Chaque valeur représente la moyenne arithmétique de 12 valeurs de zones de lyse des ensemencements effectués parallèlement.

TABLEAU XXXIX

ZONES DE LYSÉ

Durée de chauffage des plateaux	Lecture après :			
	3 h. 30	6hs.	8 hs.	25 hs.
45 minutes	21 $\pm$ 2	35 $\pm$ 3	52 $\pm$ 3	84 $\pm$ 15
1 heure	0,7 $\pm$ 0,4	5 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	64 $\pm$ 12
1 h. 30	0	0	0	0
2 heures	0	0	0	0

il faut donc un chauffage de 1 h. 30 à 80°C pour détruire complètement le plasminogène du fibrinogène utilisé dans nos conditions opératoires.

● Sensibilité des plateaux chauffés (36)

Si un tel chauffage nous débarrasse du plasminogène il diminue par contre de façon appréciable la sensibilité du plateau vis-à-vis de l'action d'un enzyme fibrinolytique. Ainsi par exemple en ensemençant avec une solution d'Alpha chymotrypsine 1/10 dans un tampon phosphate pH 7,3 (0,5 unités /ml) dont l'activité est indépendante du plasminogène, des plateaux chauffés 1 h. 30 à 80°C et des plateaux non chauffés issus de la même solution de fibrinogène, nous avons pu constater (tableau XL), une nette diminution des aires de lyse avec les plateaux chauffés traduisant un abaissement net de la sensibilité vis-à-vis de l'activité fibrinolytique de l'Alpha chymotrypsine.

Chaque valeur représente la moyenne arithmétique de 6 valeurs de zones de lyse d'ensemencements effectués parallèlement.

TABLEAU XL

Sol. Alpha chymotrypsine diluée au 1/10: zones de lyse en mm²

LECTURE APRES				
plateaux	3 h. 30	6 hs.	8 hs.	24 hs. à 37°C
chauffés 1h. 30 à 80°C	60 $\pm$ 4	80 $\pm$ 6	100 $\pm$ 10	298 $\pm$ 20
non chauffés	162 $\pm$ 7	248 $\pm$ 20	289 $\pm$ 18	700 $\pm$ 30

CONSERVATION DES PLATEAUX

Laissées à l'air libre sans couvercles les boîtes de Pétri contenant le gel de fibrine se déshydratent partiellement au bout de 7 à

8 heures ; le desséchement complet du plateau se produit au bout de 24 heures.

Munies de leurs couvercles les boîtes se conservant mieux, mais au bout de 3 à 4 heures à la température du laboratoire, une faible déshydratation se remarque par l'apparition de fines gouttelettes d'eau sur la paroi interne du couvercle ; cette condensation est plus accentuée quand les plateaux sont placés à 37°C.

Un papier filtre de diamètre approprié coincé entre le couvercle et la boîte absorbe les gouttelettes d'eau, évite leur chute sur le gel de fibrine, et permet de conserver les boîtes pendant 2 à 3 jours à la température du laboratoire.

Introduits dans une boîte métallique fermée hermétiquement, munis de leur couvercle (sans papier filtre) les plateaux se conservent une semaine au moins à la température du laboratoire.

Placées à + 4°, munies de leur couvercle sans papier filtre les boîtes se conservent sans déshydratation apparente pendant une semaine au moins.

III - T E C H N I Q U E

Protocole Opérateur

— Déposer à la surface des plaques, avec une pipette précise spéciale, en des points différents également espacés (2 à 4 points par plaque suivant les zones de lyse présumées, par exemple : 2 dans le cas des plasmas activés par la streptokinase), des gouttes de 30 mm³ de liquide à examiner:

plasma pur

plasma activé

solution d'euglobulines pures ou activées etc... et d'une solution enzymatique de référence (trypsine, Alpha chymotrypsine).

- mettre à l'étuve à 37°C
- observer l'intensité des zones de lyse autour des gouttes après 6 hs. 18 hs. et 24 hs.
- mesurer les diamètres des zones de lyse éventuelles.
- les comparer aux lyses obtenues avec les enzymes de référence.

DISCUSSION

Le dépôt des gouttes doit se faire avec une micropipette de 30 mm³ à 2 traits pour ne pas souffler et éviter ainsi les bulles d'air et la projection des petites gouttelettes sur la surface du plateau pouvant fausser la lecture des zones de lyse. L'étalement de la goutte est plus important sur les plateaux chauffés que sur les plateaux non chauffés. Ceci influence certainement la diffusion du

matériel déposé dans le gel de fibrine, qui conditionne fortement l'intensité des lyses observées.

Nous avons adopté d'une part pour le dépôt des gouttes, d'autre part pour la lecture des aires de lyse le protocole opératoire suivant :

- sur un papier millimétré bleu (lecture plus facile), nous avons tracé une circonférence correspondant au diamètre d'une boîte de pétri.
- A l'intérieur de cette surface nous avons marqué 4 points (numérotés 1, 2, 3, 4) à égale distance par rapport au centre de la circonférence.
- deux autres schémas ont été tracés de la même manière portant 2 points à égale distance du centre (1,2) et 1 point (1) au centre de la circonférence. Ces 3 schémas correspondent à des plateaux qu'on peut ensemer en 4, 2 et 1 point.

Un point de repère marqué en rouge sur les schémas et sur le bord externe du fond de chaque boîte permet le positionnement exact des dépôts pour les lectures.

En faisant coïncider les deux points de repère, on enseme en commençant par le point 1 (point de départ) les divers produits sur les points correspondants.

Pour la lecture des zones de lyse, on opère de la même manière, on lit directement sur le papier millimétré l'aire lysée (produit de deux axes perpendiculaires) correspondant à chaque point ensemené.

REMARQUES

- toutes les zones de lyse ont été observées après incubation des

plateaux à l'étuve à 37°C. Chaque boîte de Pétri a été munie d'un papier filtre pour éviter la retombée des gouttelettes de condensation de l'eau d'évaporation.

- avec les plateaux non chauffés la lecture des aires de lyse est facile, la surface attaquée est le plus souvent circulaire et nette.
- Par contre, avec les plateaux chauffés les zones de lyse étant plus réduites parfois superficielles, prennent très souvent un aspect déchiqueté, crevassé et très irrégulier; ce qui rend la lecture difficile, voir même impraticable.

RESULTATS

L'activité lytique s'exprime arbitrairement par la surface exprimée en mm², obtenue en multipliant deux axes perpendiculaires des zones de lyse mesurées en mm. :

- **Normalement** : les plasmas ou leurs fractions euglobuliniques non activés n'engendrent aucune lyse sur les plateaux chauffés ou non en 24 heures.
- **Pathologiquement** : avec des plasmas non activés une fibrinolyse faible donne des zones de 5 mm. de diamètre environ, soit une activité lytique de 25 mm².
- une fibrinolyse moyenne donne des zones de 10 mm de diamètre environ soit une activité lytique de 100 mm².
- une fibrinolyse intense donne des zones de 20 mm. de diamètre environ, soit 400 mm² d'action lytique.

- une fibrinolyse aigue donne des zones supérieures à 25 mm. de diamètre, soit une activité lytique supérieure à 625 mm².

L'activation du plasma par la streptokinase donne des zones de lyse nettement supérieures. Un plasma normal activé par la streptokinase, à la concentration de 200 U de SK par ml. de plasma dilué, a généralement en 24 heures une activité lytique correspondant à 80 mm² sur les plateaux chauffés, et à 600 mm² sur les plateaux non chauffés.



IV — REPRODUCTIBILITE DE LA TECHNIQUE

DES PLATEAUX

Intéressante en tant que microméthode puisque chaque ensemencement correspond à 30 mm³ de prise d'essai, la technique des plateaux ne semble pas bénéficier d'une bonne reproductibilité.

Ceci s'explique par la difficulté d'obtenir un dépôt régulier des gouttes par une homogénéité défectueuse du gel de fibrine (épaisseur etc...), et surtout par les difficultés rencontrées dans la lecture des zones de lyse : Aspect irrégulier rendant parfois l'estimation de leurs surfaces très approximative (zones non circulaires, superficielles) particulièrement marqué dans les plateaux chauffés.

Dans nos essais, nous avons étudié cette reproductibilité de la technique par des ensemencements d'un même produit sur un même plateau chauffé ou non chauffé et sur des plateaux différents issus de la même solution de fibrinogène.

Nos lectures ont été faites après séjour des plateaux à 37°C., à des intervalles de temps différents.

Dans les tableaux XLI, XLII nous donnons les résultats des zones de lyse en mm², de deux séries de déterminations.

Une série (tableaux XLI) avec des ensemencements de 30 mm² d'un mélange de plasmas recueillis sur héparine, activé par la streptokinase à 200 U. SK par ml de plasma dilué, sur un plateau chauffé et 2 plateaux non chauffés (1) et (2) issus de la même solution de fibrinogène.

Une autre série (tableau XLII) avec des ensemencements de 30 mm³ d'une dilution de la solution mère d'Alpha chymotrypsine au 1/10 dans un tampon phosphate pH 7,3 sur des plateaux chauffés 1 h. 30 à 80°C.

TABEAU XLI

Etude de la reproductibilité des lyses avec un plasma activé.

Lectures	Plateau chauffé				Plateau non chauffé (1)				Plateau non chauffé (2)			
	4 points				4 points				4 Points			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	2	4
3 h. 30	30	30	36	30	144	165	142	144	124	142	121	100
6 heures	30	36	36	36	206	195	169	206	182	180	169	169
22 heures	32	42	42	42	870	780	729	870	870	870	841	841
24 »	36	42	42	46	900	780	729	900	992	900	900	930

TABLEAU XLII

Etude de la reproductibilité des lyses avec une solution
de Chymotrypsine diluée au 1/10

PLATEAUX CHAUFFES

Lectures	1	2	1	2	1	2
3h. 30	56	64	56	64	64	64
6 heures	90	90	90	81	64	64
8 heures	90	100	100	110	90	100
24 heures	324	306	289	306	272	289

Dans la première série nous remarquons pour la lecture après 24 heures avec le plateau chauffé que la moyenne des valeurs est

$41 + 5$: l'erreur relative maximale est de : $\frac{5}{36} \times 100 = 14 \%$;

avec les plateaux non chauffés la moyenne étant $880 + 151$, l'er-

reur relative maximale est de : $\frac{151}{729} \times 100 = 20 \%$; l'erreur re-

lative maximale pour un même plateau étant de

$$\frac{98 \times 100}{729} = 13,5 \text{ } \circ / \circ \quad \text{ou} \quad \frac{52 \times 100}{930} = 6 \text{ } \circ / \circ$$

Dans la deuxième série la moyenne pour la lecture après 24 heures est de $298 + 26$, l'erreur relative maximale pour les plateaux est : $\frac{26 \times 100}{272} = 10\%$; l'erreur pour un plateau étant de

$$\frac{9 \times 100}{272} = 3,3 \text{ } \circ / \circ \quad \frac{9 \times 100}{289} = 3,1 \text{ ou}$$

$$\frac{9}{272} = 3,$$

CONCLUSION

L'erreur étant variable dans une zone de 3 à 20 %, il est donc conseillé pour une interprétation satisfaisante des résultats avec la technique des plateaux, de pratiquer l'ensemencement d'un même produit au moins en double sur deux plateaux, et de faire la moyenne des chiffres de lectures s'ils ne sont pas très éloignés.

V — ETUDE DE L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE DE LA STREPTOKINASE SUR LES PLATEAUX CHAUFFES ET NON CHAUFFES

La streptokinase active le plasminogène des plasmas humains, mais pas le plasminogène bovin réfractaire à cette action directe.

Pour pouvoir activer le plasminogène bovin la streptokinase a besoin d'un co-activateur fourni par le plasma humain (82).

Le fibrinogène utilisé pour préparer les plateaux étant d'origine bovine, nous avons vérifié l'effet de la streptokinase utilisée pure à différentes concentrations sur les plateaux chauffés et non chauffés.

Des concentrations de streptokinase à 100, 200, 400 et 800 unités par ml de tmapon pH 7,3 ensemencés sur des plateaux chauffés et non chauffés nous ont donné des zones de lyse indiquées dans les tableaux ci-dessous.

La lecture de ces zones de lyse est faite en fonction de la durée d'incubation à 37°C et les résultats sont exprimés en mm₂ (tableau XLIII).

Les lyses observées sur les plateaux chauffés sont très super-

ficielles et à peine visibles. Celles des plateaux non chauffés sont plus nettes mais pas très profondes: elles n'atteignent pas toute l'épaisseur du film de fibrine.

Ces lyses sont donc peu comparables à celles obtenues par fibrinolyse vraie.

La streptokinase a une activité pratiquement nulle sur les plateaux chauffés même à fortes concentrations et après 29 heures d'incubation. Sur les plateaux non chauffés l'activité est très faible, elle augmente très légèrement suivant la concentration.

Dans les deux sortes de plateaux l'action de la streptokinase se manifeste très rapidement et s'arrête au bout de 3 à 8 heures au maximum.

Conservées congelées à -20°C pendant 24 heures et 72 heures, les solutions de streptokinase ont gardé une même activité.



TABEAU XLIII

Lyses obtenues avec une solution de streptokinase

PLATEAUX CHAUFFES							PLATEAUX NON CHAUFFES						
Streptokinase	Unités / m l	Lecture après					Lecture après						
		3h.30	6hs	8hs	11hs	24h	29h	3h.30	6hs	8hs	11hs	24hs	29hs
100		9	9	9	9	9	9	25	25	30	30	30	30
200		9	9	9	9	9	9	30	30	36	36	36	36
400		9	9	9	9	9	9	36	36	36	36	36	36
800		9	9	9	9	9	9	49	49	49	49	49	49

VI — SIGNIFICATION DE LA METHODE DES PLATEAUX

A — Activation du Plasma humain par la streptokinase

La quantité optimale de streptokinase nécessaire pour activer un plasma humain normal est de 200 U/ml de mélange (63).

Cette quantité a été choisie de manière, à activer suffisamment le plasma pour transformer tout le plasminogène en plasmine, en inhibant l'action des antistreptokinases éventuellement présentes, et à éviter de trop fortes doses de streptokinase pouvant avoir un effet inhibiteur.

Pour étudier les limites de cette activation et sa signification dans la méthode des plateaux, à partir d'un mélange de plasmas différents recueillis sur héparine, nous avons activé différentes parties aliquotes avec des doses croissantes de streptokinase : 100, 200, 400, 800 Unités par ml de plasma dilué. Chaque plasma ainsi activé a étéensemencé sur deux plateaux chauffés et deux non chauffés.

Les zones de lyse ont été lues en fonction du temps après incubation des plateaux à 37°C.

Sur chaque plateau un ensemencement de plasma non activé a été pratiqué comme référence.

Nous trouvons dans le tableau suivant (tableau XLIV) les résultats obtenus avec une série de nos essais.

Des résultats parallèles ont été trouvés dans 3 autres séries de déterminations effectuées avec des mélanges de plasma, des lots de plateaux et à des dates différents.

TABLEAU XLIV

	PLATEAUX CHAUFFES						PLATEAU NON CHAUFFES					
	L E C T U R E S						L E C T U R E S					
	3h,30	6 h.	8 h.	11 h.	24 h.	29 h.	3 h. 30	6 h.	8 h.	11 h.	24 h.	29 h.
Plasma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
« pur » activé par												
SK 100 U/ ml	16	25	40	39	49	72	80	110	132	156	256	272
SK 200 U/ ml	30	49	49	49	81	81	121	210	255	361	529	604
SK 400 U/ ml	25	30	36	36	81	81	182	256	361	441	930	1089
SK 800 U/ ml	30	36	36	36	72	78	256	380	506	676	1369	1600

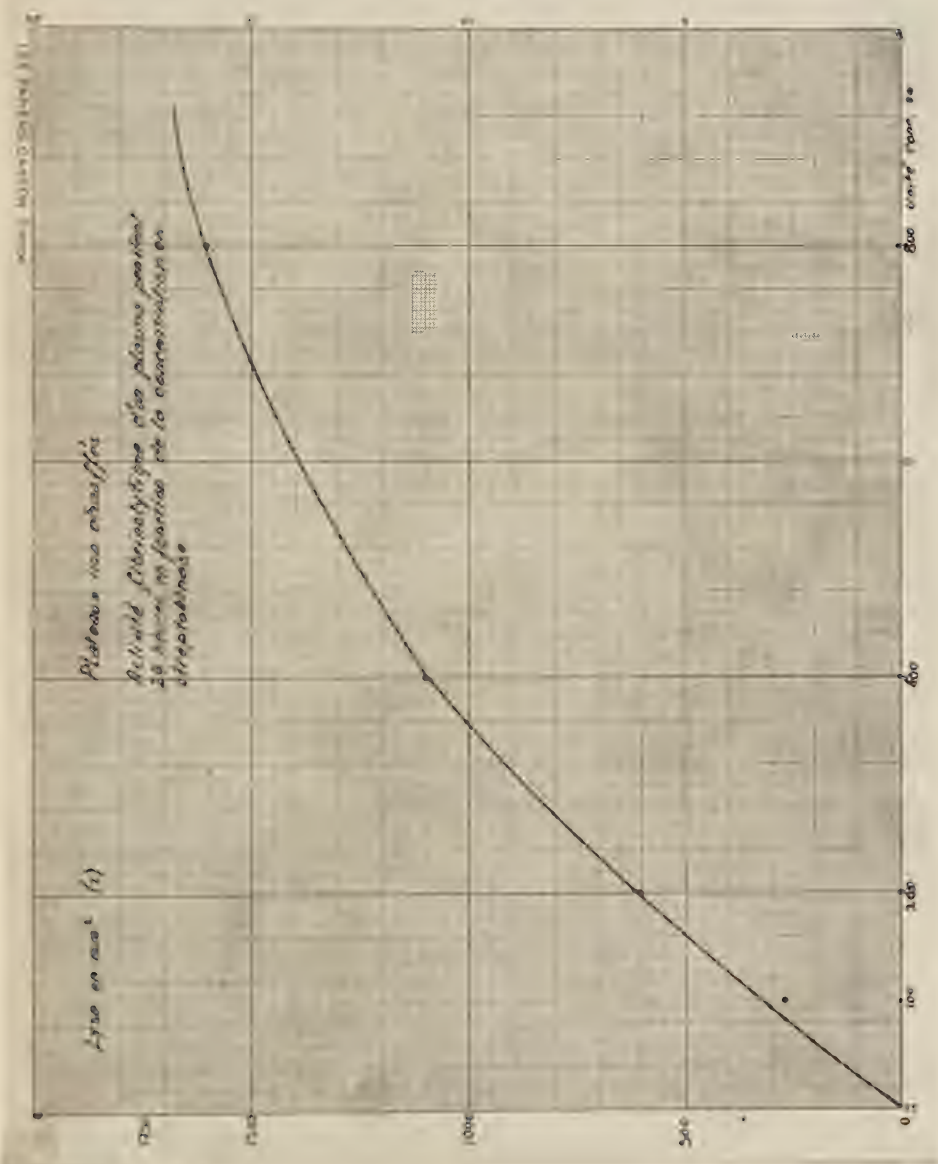
Avec des plateaux chauffés l'augmentation de la dose de streptokinase n'accroît pas la fibrinolyse, les résultats étant identiques si l'on tient compte de la précision possible. L'évolution de l'activité en fonction du temps se fait lentement, par contre le maximum est atteint au bout de 24 heures pour les doses supérieures à 200 U. Il faut donc bien 200 U. SK/ml de plasma dilué pour avoir l'activation complète du plasma en 24 heures.

Comme le montrent les courbes (1) et (2), avec les plateaux non chauffés l'activité fibrinolytique est fonction de la dose de streptokinase (1), mais elle n'est pas proportionnelle à la concentration en streptokinase pour des doses supérieures à 200 U. L'évolution de cette activité en fonction du temps se fait pratiquement suivant une droite entre 3 hs. et 24 hs. puis il y a un léger aplatissement (2) ceci laisse donc supposer que l'activité fibrinolytique est fonction de la concentration de la streptokinase qui active le plasminogène du plasma humain mais surtout, en présence **du plasma humain**, le plasminogène bovin qui accompagne **le fibrinogène bovin** des plateaux non chauffés en quantité très **importante**.

Reste à définir le rôle exact du plasminogène **apporté par le plasma humain** activé à côté du co-activateur.

Ceci nous amène à étudier l'activité fibrinolytique sur plateaux non chauffés en fonction de l'apport plasmatique.

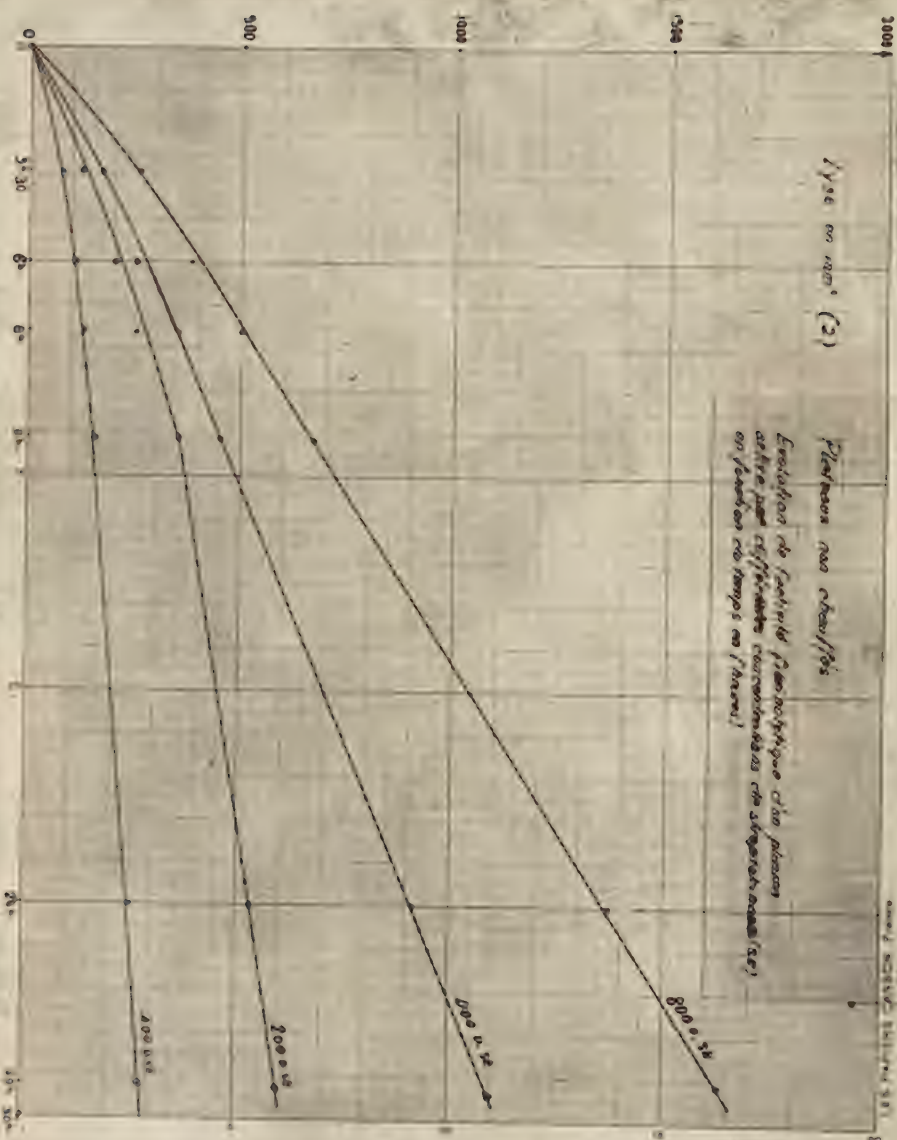
Notons que le plasma humain non activé utilisé pur n'a donné aucune lyse sur les deux sortes de plateaux.



Lise no vapor (2)

Plumbeum non chlorifera

Exatidão de 1/10000 (análise química dos produtos
obtidos para diferentes concentrações de vapor de água (ar)
em função do tempo em (horas))



B — VARIATIONS DE L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE

EN FONCTION DE L'APPORT PLASMATIQUE

a) — sur plateaux non chauffés

Nous avons plus ou moins dilué le plasma avec du tampon phosphate pH 7,3, et l'avons activé après dilution avec une dose constante de streptokinase soit 200 U/ml de mélange.

Nos premiers essais ont porté sur des dilutions au 3/4 (3 parties plasma, 1 partie tampon pH 7,3), 1/2, 1/4 et dans chaque série de déterminations un ensemencement de plasma pur (non dilué mais activé) a été pratiqué comme référence.

Nous avons constaté que l'activité fibrinolytique augmentait avec la dilution.

Avec la dilution au 1/10 nous avons observé ensuite un phénomène identique, nous avons alors pratiqué des dilutions plus fortes allant du 1/10 au 1/1000; les résultats obtenus dans un de nos essais (tableau XLV) ont été confirmés par d'autres.

Une augmentation nette de l'activité se remarque jusqu'à la dilution au 1/100; à cette dilution l'activité est proche de celle du plasma pur. Une activité inférieure mais non négligeable se manifeste avec la dilution au 1/1000.

TABLEAU XLV

Etude des effets de la dilution sur l'intensité des lyses
sur plateaux non chauffés.

Plasma activé	Lectures après incubation à 37°C		
	3 h. 30	7 heures	24 heures
» pur	95	196	576
dilué au 1/10	134	276	840
» » 1/20	110	272	841
» » 1/100	76	206	528
» » 1/500	100	138	380
» » 1/1000	65	145	360

DISCUSSION

L'augmentation de l'activité en fonction de la dilution ne peut s'expliquer que par une diminution de l'action d'inhibiteurs présents dans le plasma pur.

Le plasminogène apporté par le plasma humain ne semble pas jouer un rôle important, c'est surtout le co-activateur du plasma humain nécessaire pour l'activation du plasminogène bovin par la streptokinase qui paraît avoir le rôle principal; jusqu'à la dilution au 1/100, ce co-activateur est suffisamment actif, au-delà de cette dilution son activité diminue.

Pour préciser le rôle du plasminogène du plasma humain et de son co-activateur, nous avons repris les essais précédents, d'une part sur des plateaux chauffés où le plasminogène bovin est détruit, d'autre part avec une solution des euglobulines du plasma sur les deux sortes de plateaux, ce fractionnement étant considéré comme éliminant les inhibiteurs (108).

b) sur plateaux chauffés

Les résultats obtenus avec deux plasmas différents (tableaux XLVI, XLVII) montrent que avec les plateaux chauffés, les dilutions du plasma n'augmentent pas l'activité fibrinolytique: jusqu'à la dilution au 1/4 l'activité est constante, par contre avec des dilutions entre 1/10 et 1/100 l'activité diminue très fortement et avec des dilutions supérieures à 1/500 l'activité est nulle.

Etude des effets de la dilution **sur l'intensité des lyses** **sur plateaux chauffés**

TABLEAU XLVI

Plasma activé	P L A T E A U X C H A U F F E S			
	3 h. 30	6 hs.	8 hs.	24 hs.
« pur	25	36	42	56
dilué au 1/3	25	36	42	56
« au 1/4	25	36	42	49
« au 1/10	20	30	30	35

TABLEAU XLVII

	<u>PLATEAUX CHAUFFES</u>		
	<u>LECTURES</u>		
	3h.30	7hs	24hs
Plasma activé			
Plasma pur	42 *	52	81
dilué au 1/10	4 *	26 *	48
» au 1/20	2 *	20	36 *
» » 1/100	0	12 *	22 *
» » 1/500	0	0	0
» » 1/1000	0	0	0

* Les zones de lyse sont superficielles dans ces cas

C — VARIATIONS DE L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE
SUR PLATEAUX CHAUFFES ET NON CHAUFFES
EN FONCTION DE L'APPORT DE SOLUTION DES
EUGLOBULINES, COMPARAISON AVEC LE PLASMA

1° — Les euglobulines d'un même mélange de plasma recueillis sur héparine précipitées à pH 5,8 ont étéensemencées sur deux plateaux chauffés et deux non chauffés (tableaux XLVIII, XLIX).

Un ensemencement de solution d'euglobulines pures a été pratiqué comme référence.

Comparaison de l'activité lytique des plasmas activés
et des euglobulines correspondantes en fonction
de la dilution.

TABEAU I

P L A T E A U X				C H A U F F E S			
L E C T U R E S				L E C T U R E S			
Plasma activé	3 h. 30	7 h.s	24 hs.	Euglobulines activées	3 h. 30	7 hs.	24 hs.
" pur	42 *	52	81	" pures	52 *	70	105
dilué 1/10	4 *	26 *	48	dilués 1/10	32 *	49	72
» 1/20	2 *	20 *	36 *	» 1/20	22 *	27	44
» 1/100	0	12 *	22 *	» 1/100	0	21 *	21 *
» 1/500	0	0	0	» 1/500	0	0	0
» 1/1000	0	0	0	» 1/1000	0	0	0

TABLEAU LI

PLATEAUX NON CHAUFFES							
LECTURES				LECTURES			
Plasma activé	3 h. 30	7 h.s	24 hs.	Euglobulines activées	3 h. 30	7 hs.	24 hs.
» pur	95	196	576	» pures	184	371	1296
dilué 1/10	134	276	840	diluées 1/10	150	316	1089
» 1/20	110	272	841	» 1/20	144	324	1023
» 1/100	76	206	528	» 1/100	116	255	756
» 1/500	100	138	380	» 1/500	105	162	280
» 1/1000	85	145	360	» 1/1000	86	116	217

* Zones de lyse superficielles

** Zones de lyse très superficielles

Dans les deux cas les zones de lyse ont été lues en fonction du temps après incubation des plateaux à 37 °C, et nous avons calculé pour chaque cas la moyenne des deux résultats exprimés en mm₂

Ces résultats ont été confirmés par des résultats parallèles trouvés dans d'autres séries de déterminations.

Comparaison de l'activité lytique des euglobulines sur plateaux chauffés et non chauffés.

TABLEAU XLVIII

Euglobulines activées	PLATEAUX CHAUFFES			
	L E C T U R E S			
	3 h. 30	6 hs.	8 hs.	24 hs.
» pures	42	56	56	81
diluées au 1/2	36	49	49	72
» « 1/14	36	49	49	66
« » 1/10	36	42	42	56

TABLEAU XLVII

Euglobulines activées	PLATEAUX NON CHAUFFES			
	L E C T U R E S			
	3 h. 30	6 hs	8 hs.	24 hs.
» pures	144	289	380	1406
diluées au 1/2	121	240	361	1248
» » 1/4	132	240	361	1053
» » 1/10	132	289	361	1026

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

PLATEAUX CHAUFFES :

Avec les dilutions (1/2 au 1/10) l'activité fibrinolytique de la solution d'euglobulines diminue légèrement et de manière peu significative (tableau XLVIII).

En comparant l'activité du plasma et des euglobulines (tableau L), une augmentation de l'activité lytique prouve qu'il y a bien élimination d'inhibiteurs. Comme pour le plasma l'activité s'affaiblit à la dilution au 1/100, et s'annule aux dilutions 1/500, 1/1000. Comme la lyse est identique avec le plasma et la solution d'euglobulines diluées au 1/100, les inhibiteurs contenus dans le plasma et éliminés par la précipitation des euglobulines ont donc perdu leur activité par simple dilution à ce titre.

PLATEAUX NON CHAUFFES:

Avec les faibles dilutions (1/2 au 1/10) (tableau XLIX) l'activité fibrinolytique de la solution d'euglobulines diminue légèrement et de manière peu significative, mais pas proportionnellement à la dilution. Le co-activateur est encore en quantité suffisante dans ces dilutions pour permettre l'activation du plasminogène bovin par la Streptokinase.

En comparant les résultats obtenus avec le plasma et les euglobulines correspondantes (tableau LI) nous remarquons que :

1° — l'activité est supérieure pour les dilutions faibles dans le cas des euglobulines ce qui doit correspondre à l'élimination d'inhibiteurs. Ceci semble confirmé par l'augmentation d'activité avec les dilutions au 1/1^{er} ou au 1/20 du plasma.

2° — l'activité est plus forte pour les dilutions de plasma supérieures à 1/500 que pour les dilutions correspondantes d'euglobulines. L'explication de ce phénomène ne nous semble pas possible dans l'état actuel de nos connaissances sur les activateurs et les inhibiteurs. Peut être est-il permis de suggérer que :

- le rapport d'activité relative entre inhibiteurs et activateurs varie avec les inhibiteurs et les activateurs.
- la dilution agit plus fortement pour diminuer l'activité des inhibiteurs que celle de certains activateurs. Ceci s'explique peut être par le fait que les inhibiteurs agissent suivant des réactions stoechiométriques fonction de leur concentration dans le milieu, alors que les activateurs et le plasminogène agissent suivant des réactions de type enzymatique.

VII — INFLUENCE DE L'ANTICOAGULANT SUR L'ESTIMATION D'UNE ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE PLASMATIQUE PAR LA TECHNIQUE DES PLATEAUX

Nombreux sont les auteurs qui ont étudié ce problème, mais leurs avis restent partagés surtout en ce qui concerne l'action de l'héparine sur la fibrinolyse.

ASTRUP (T) et STRENDORFF (I) (10) étudiant les effets de la solution de citrate de solution sur l'activité fibrinolytique d'un plasma activé signalent une exaltation de cette activité. Le citrate agirait surtout au niveau des activateurs.

Les travaux concernant l'influence de l'héparine sur la fibrinolyse sont contradictoires. Tandis qu'un certain nombre d'auteurs lui attribuent un rôle activateur, d'autres ont décrit une action inhibitrice.

Pour HALSE (T) (42), l'héparine ainsi que les héparinoïdes de synthèse activent la fibrinolyse et la thrombolyse.

KONTTINEN (Y) (50) attribue à l'héparine deux effets opposés : stimulation aux faibles concentrations, ralentissement pour les concentrations élevées.

Pour GIACOMAZZI (41), l'action fibrinolytique paraît ralentie par la présence de l'héparine. Le mécanisme de cette inhibition reste inconnu, mais il est d'une intensité proportionnelle à la concentration de l'héparine.

VON KAULLA (110) a montré qu'à fortes doses l'héparine retarde la fibrinolyse provoquée par l'urokinase sur un film de fibrine bovine contaminée par le plasminogène, par contre à faibles concentrations l'activité fibrinolytique est augmentée occasionnellement (110).

Récemment HOLEMANS (R), ADAMIS (D), HORACE (J.F) (43) ont montré que l'héparine inhibe in vitro l'activité fibrinolytique du plasma. Cette action inhibitrice semble se produire au niveau des activateurs. Par contre cet effet inhibiteur est absent pour les euglobulines humaines, et l'activité de la plasmine n'est pas influencée par l'héparine.

Le mélange de Wintrobe, la solution de citrate et l'héparine (cf page 92), étant les anticoagulants couramment utilisés, nous avons contrôlé leur influence sur l'activité fibrinolytique de plasmas, estimée par la technique des plateaux suivant notre mode opératoire.

Pour cela le même sang a été prélevé parallèlement sur les trois anticoagulants mentionnés ci-dessus, les plasmas respectifs recueillis, activés par la streptokinase à la dose de 200 U/ml de mélange ont été ensemencés chacun sur deux plateaux chauffés et deux non chauffés.

La lecture des zones de lyse a été faite 18 heures et 24 heures après incubation des plateaux à 37°C, et nous avons calculé pour chaque cas la moyenne des deux résultats exprimés en mm₂

Dans les tableaux (LII, LIII), nous trouvons les résultats de plusieurs séries de déterminations effectuées avec des sangs différents.

Chaque série est effectuée sur plateaux chauffés et non chauffés
ensemencés avec les mêmes prélèvements.

Influence des anticoagulants sur l'activité lytique

TABEAU LII

		P L A T E A U X			C H A U F F E S		
Anticoagulant	Sang No.	Lecture après 18 h. d'incubation à 37°C			Lecture après 24 h. d'incubation à 37°C		
		Wintrobe	Citrate	Héparine	Wintrobe	Citrate	Héparine
	1	25	36	36	36	49	42
	2	36	36	42	36	42	49
	3	72	64	64	72	64	64
	4	—	64	64	—	64	64
	5	64	64	64	—	64	64
	6	49	49	49	81	64	64
	7	—	240	255	—	255	272
	8	36	35	36	48	49	49
	9	48	49	49	70	64	64
	10	64	64	56	64	64	56

TABLEAU LIII

P L A T E A U X N O N C H A U F F E S

Anticoagulant	Lecture après 18 h. d'incubation à 37°C			Lecture après 24 h. d'incubation à 37°C		
	Wintrobe	Citrate	Héparine	Wintrobe	Citrate	Héparine
sans N°						
1	900	900	900	1225	1225	1225
2	841	900	841	1156	1296	1156
3	961	841	984	1225	1225	1156
4	—	961	961	—	1122	1122
5	729	900	900	841	1122	1122
6	804	729	729	930	900	900
7	—	1122	1122	—	1260	1296
8	1365	1332	1332	1591	1591	1591
9	650	625	600	702	702	625
10	648	624	462	756	729	576

DISCUSSION

Les variations observées sont irrégulières et restent dans les limites de reproductibilité des déterminations. Nos essais précédents montrent que les dilutions apportées par le citrate et l'oxalate ne peuvent intervenir.

Pratiquement, il est donc indifférent d'utiliser l'un quelconque des trois anticoagulants.

C O N C L U S I O N S

Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence l'extrême complexité des facteurs qui interviennent sur l'intensité des lyses observées.

Il nous semble donc impossible d'attribuer à l'un ou l'autre de ces facteurs les modifications que l'on peut constater sur les plateaux non chauffés ou sur les plateaux chauffés avec le plasma ou les euglobulines, activées ou non. Ces modifications nous semblent dépendre de la résultante des actions antagonistes de l'ensemble des facteurs et ne peuvent être interprétées que d'un point de vue global et empirique, fonction des résultats cliniques connus. Les techniques proposées par différents auteurs doivent être respectées scrupuleusement dans tous leurs détails y compris la qualité des réactifs pour que les résultats obtenus puissent être comparables.

De très faibles variations suffisent à expliquer les résultats contradictoires observés par différents auteurs.

Pour l'interprétation clinique, il semble que les résultats des techniques utilisant le plasma pur soient moins criticables que ceux où l'on fait subir au plasma des traitements divers, dilution, activation, fractionnement par exemple, dont il est impossible de connaître les effets exacts.

APPLICATIONS CLINIQUES

Nous avons effectué des déterminations de plasminogène suivant notre technique sur 98 malades différents.

Ces essais ne constituent qu'un début d'étude que nous poursuivrons pour préciser les valeurs normales et pathologiques et essayer de mettre en évidence le rapport entre certaines anomalies et la clinique.

Nous avons d'abord déterminé les valeurs normales sur 19 donneurs de sang. La valeur moyenne calculée sur les résultats rapportés dans le tableau LIV est de 68 unités, les écarts maxima trouvés sont par rapport à cette moyenne de $- 29$ et $+ 21$, mais 14 déterminations sur 19 soit environ 75 % sont dans les limites comprises entre 68 ± 12 unités.

Dans le cadre de cette étude préliminaire nous admettons donc que les valeurs normales varient généralement entre 56 et 80 unités avec des valeurs extrêmes de 40 à 97.

Signalons que des résultats obtenus auparavant sur 12 mélanges différents de plasmas de malades divers nous ont donné une valeur moyenne de 74 ± 21 unités.

Ces valeurs correspondent parfaitement à celles indiquées par SHERRY.

TABLEAU LIV

No. dosage	Plasminogène (unités)	Ecart (par rapport à la valeur moyenne).
39. B.	61,0	— 7,3
40. B.	87,5	+ 9,2
41. B.	89,8	+ 21,5
42. B.	79,3	+ 11
43. B.	69,3	+ 1,0
44. B.	79,3	+ 11
45. B.	69,3	+ 1,0
46. B.	82,5	+ 14,2
47. B.	75,9	+ 7,6
48. B.	69,3	+ 1,0
49. B.	69,3	+ 1,0
50. B.	72,6	+ 4,3
51. B.	39,6	— 28,7
52. B.	79,3	+ 11
53. B.	79,3	+ 11
54. B.	56,1	— 12,2 ,
55. B.	56,1	— 12,2 ,
56. B.	39,6	— 28,7
57. B.	42,9	— 25,4

Nous avons étudié un certain nombre de cas physiologiques et pathologiques pour lesquels nous avons trouvé des résultats conformes à ceux que nous attendions d'après les indications que nous avons trouvées dans la littérature.

Pour les cas physiologiques nous avons effectué des déterminations chez 22 femmes en cours de grossesse et chez 20 femmes nouvellement accouchées.

D'après ses résultats rapportés dans le tableau LV nous constatons une augmentation nette en cours de grossesse. La moyenne de nos 22 déterminations est de 110 unités avec des valeurs généralement comprises entre 102 et 133 puisque 4 cas seulement soit 20 % environ sont entre 84 et 99 unités et 1 seul cas soit 5 % est inférieur au maximum des valeurs normales habituelles. Notons que les valeurs inférieures à 102 unités n'ont été trouvées dans aucun des 8 cas de grossesse de plus de 8 mois.

Les résultats des 20 accouchées depuis moins de 48 heures que nous avons pue étudier montrent une augmentation moins nette que pendant la grossesse. La moyenne est de 96 unités avec des valeurs extrêmes de 54 à 135 unités, et 5 cas seulement sont inférieurs à 80 unités.

L'étude des résultats permet de se demander si l'abaissement du taux de plasminogène au moment de l'accouchement n'est pas fonction des conditions de cet accouchement (importance de l'hémorragie, etc...).

Parmi les cas pathologiques rapportés dans le tableau LVI nous nous sommes attachés surtout aux cirrhotiques chez lesquels nous espérons trouver des valeurs abaissées. Effectivement la moyenne des 27 cas étudiés est de 34 unités. Dans 5 cas soit 18 % nous avons trouvé des valeurs normales (supérieures à 56 unités) et dans 5 autres cas des valeurs comprises entre 40 et 56 unités.

TABLEAU LV

1 — Grossesse en cours

No dosage	Malades	Age de la grossesse (mois)	Plasminogène (unités)
2	BOU. J.	7 ¹ / ₂	84,1
3	SOP. R.	terme	155,5
4	MAR. J.	7 ¹ / ₂	105,6
6	SOE. G.	3 ¹ / ₂	104,0
7	FER. D.	8 ¹ / ₂	133,7
8	ALL. M.	terme	110,5
9	LOU. S.	7 ¹ / ₂	123,7
10	MIH. B.	6 ¹ / ₂	132,0
11	BOU. C.	terme	125,5
19	HIS. S.	8	127,0
20	SAB. M.	6 ¹ / ₂	99,0
23	BEN. H.	7	155,5
24	HAM. M.	7	87,5
31	—	terme	127,0
34	KRI. Z.	terme	123,8
36	PER. G.	5 ¹ / ₂	102,3
40	BER. G.	5	94,0
43	FRE. G.	5	59,4
46	DEV. C.	5 ¹ / ₂	102,3
49	CHA. M.	7 ¹ / ₂	155,5
50	GRA. A.	8 ¹ / ₂	104,0
30	PAB. A.	7 ¹ / ₂	127,0

II - A c c o u c h é e s

No. dosage	Malades	Plasminogène (unités)
1	BOU. H.	89,0
5	LEP. R.	92,4
12	COR. M.	85,8
13	BOU. M.	107,0
15	WOL. A.	82,5
16	DEN. N.	99,0
17	KAD. J.	79,2
18	BEL. H.	118,8
21	GIO. D.	77,5
25	HAM. R.	54,4
26	CHE. Z.	135,2
27	SAM. M. A.	125,3
28	DRO. J.	99,0
29	DUM. A.	112,2
33	RUK. P.	118,8
39	PER. A.	99,0
41	LAU. D.	69,3
42	BAT. H.	82,5
45	MEH. Y.	125,4
48	MAR. P.	72,5

On peut admettre que chez ces malades la synthèse du plasminogène par le foie n'est pas encore perturbée.

Par contre chez 9 malades nous avons trouvé des taux inférieurs à 20 unités. Cet abaissement marqué semble être un signe d'une synthèse très perturbée. Une étude plus approfondie est nécessaire pour pouvoir établir un rapport entre l'importance de la diminution observée (jusque 3 unités) et le degré d'évolution de la cirrhose.

Nous avons effectué aussi :

— 5 déterminations chez des cardiaques parmi lesquels nous avons trouvé 2 résultats normaux, 1 résultat à la limite inférieure et deux cas nettement abaissés.

— 5 déterminations chez des malades diverses de gynécologie chez qui nous avons trouvé 4 résultats normaux et 1 résultat nettement augmenté.

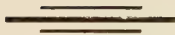


TABLEAU LVI

1° - CIRRHOSES

<u>No. dosage</u>	<u>Malades</u>	<u>Plasminogène (unités)</u>
1 B.	CAR.	6,6
2 B.	CHA.	34,8
3 B.	DON.	39,8
4 B.	PAN.	6,6
5 B.	GER.	87,9
6 B.	BRE.	59,7
10 B.	—	3,3
12 B.	—	13,2
12 B.	—	6,6
13 B.	—	19,8
15 B.	GOU.	33,0
16 B.	BAB.	66,0
17 B.	CHA.	46,2
18 B.	GUI.	61,0
19 B.	KRI.	71,0
20 B.	DEL.	43,0
22 B.	GUI.	29,7
23 B.	PER.	13,2
29 B.	DNR.	41,2
30 B.	HOM.	54,5
32 B.	BAR.	4,9
33 B.	BEK.	13,2

Cirrhoses (suite)

No. dosage	Malade	Plasminogène (unités)
34 B.	FIG.	19,8
33 B.	DEL.	29,7
36 B.	BOU.	46,2
37 B.	NIK.	26,4
38 B.	LAU.	36,3

2. - Cardiopathies

7 B.	REO.	56,20
8 B.	NIG.	28,10
9 B.	GAY.	42,90
21 B.	GAU.	64,40
31 B.	DES.	24,75

3° – GYNECOLOGIE

N° dosage	Diagnostic	Malade	Plasminogène (unités)
37	Oligoménorrhée	LAB. J.	77,5
38	Stérilité	BUR. C.	72,5
44	Hystérectomie chez une femme ménoposée	TOR. J.	108,9
14	Avant curetage d'une grossesse de 3 mois	MOU. S.	79,1
22	Hématome rétro- placentaire	URV. MT.	56,0

• •

RESUME

FIBRINOGENE

Nous avons montré que l'utilisation de réactifs contenant des antihéparines permet d'effectuer des dosages de fibrinogène sur prélèvements héparinés et chez des malades soumis à des traitements hépariniques intenses (circulation extra corporelle par exemple).

Nous proposons trois techniques : méthode précise par pesée, semi microméthode, et technique rapide chronométrique..

DETERMINATION DU PLASMINOGENE **PAR CASEINOLYSE**

Nous avons précisé les conditions opératoires, précipitation des euglobulines à pH $5,8 \pm 0,1$ en particulier, permettant d'obtenir une technique reproductible. Il semble que cette détermination ne correspond pas au dosage d'une protéine déterminée, le plasminogène, mais plutôt à la mesure d'une activité lytique influencée par la présence d'inhibiteurs et d'activateurs mal déterminés dans le précipité d'euglobulines.

Nous proposons donc de considérer cette technique comme une détermination caséïnolytique du précipité des euglobulines et non comme une détermination du plasminogène. L'étude de quelques cas cliniques (grossesse, cirrhoses), montre des variations significatives.

ETUDE CRITIQUE DE LA METHODE **DES PLATEAUX**

Les conditions opératoires et la pureté des réactifs utilisés

influencent très sensiblement les résultats obtenus.

L'activité fibrinolytique sur plateaux de fibrine chauffés ou non, à partir du plasma ou des euglobulines extraites, activés ou non, doit être considérée comme des mesures empiriques d'activité fibrinolytique globale résultant d'équilibres complexes. Les résultats ne peuvent être interprétés que par rapport aux valeurs normales trouvées dans des conditions opératoires strictement identiques : augmentation ou diminution de l'activité globale.

La technique originale d'ASTRUP est donc une bonne méthode de mesure d'activité fibrinolytique spontanée du plasma pur, mais il nous paraît très difficile d'interpréter les variations observées avec toutes les modifications que l'on peut y apporter : précipitation des euglobulines, activation etc...

B I B L I O G R A P H I E

- 1 — ABLONDI (F.B.) et HAGAN (J.J.)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1958, **99**, 769
- 2 — ALKJEARSIC (N) FLETCHER (A.P.) et SHERRY (S)
J. Biol. Chem. 1958, 233, 86
- 3 — ALKJEARSIG (N) FLETCHER (A.P.) et SHERRY (S)
J. Biol. Chem. 1959, **234**, 832
- 4 — ARDRY (R)
Biol. Méd. 1955, **44**, 698
- 5 — ARDRY (R)
Ann. Biol. Clin. 1960, **18**, 485
- 6 — ASTRUP (T)
Advances Enzymol. 1950, **10**, 32
- 7 — ASTRUP (T)
Acta. physiol. Scand. 1944, 7 suppl. 21
- 8 — ASTRUP (T) et PERMIN (P.M.)
Nature 1947, **159**, 681
- 9 — ASTRUP (T), MULLERTZ (S)
Arch. Biochem. Biophys. 1952, **40**, 346
- 10 — ASTRUP (T) STERN DORFF (L)
Thromb. Diath. Hoemor. 1960, **4**, 462
- 11 — ASTRUP (T), CROOKSTON (J) et MAC INTYRE (A)
Acta. Physiol. Scand. 1950, **21**, 238
- 12 — ASTRUP (T) et ALKJEARSIG (N)
Nature, 1952, **169**, 314

- 13 — BAILEY (K) et BETTELHEIM (F.R.)
Biochim. Biophys. Acta 1955, **18**, 495
- 14 — BEAUMONT (J.L.)
Recherches sur la coagulation du sang à l'état
normal et dans les thromboses intravasculaires,
Thèse Doct. Méd. Paris 1954, 35, 38
- 15 — BETTELHEIM (F.R.)
Biochim. Biophys. Acta 1956, **19**, 121
- 16 — BERGSTROM et WALLEN (P)
Ark. Kemi. Sverige 1961, **6**, 17, 152
- 17 — BIGGS (R) et MAC FARLANE (R.C.)
Human blood coagulation and its disorders 1957
Blackwell, Edit. Oxford
- 18 — BLIX (S)
in «Studies on the fibrinolytic system in human
plasma»
Ed. Norwegian Universities Presse Oslo 1962
- 19 — BLIX (S)
Acta — Med. Scand. 1962, **171**, 1
- 20 — BLIX (S)
Scand. J. Clin. lab. Invest 1962, **14**, 528
- 21 — BLOMBACK (B)
Acta. Chem. Scand. 1956, **10**, 147
- 22 — BLOMBACK (B) et BLOMBACK (M)
Arkiv. f. Kemi, 1956, **10**, 415
- 22 bis — BOUVIER (C.A.) BANG (U) et CLIFFTON (E.E.)
J. Suisse de Médecine 1960, **44**, 1246

- 24 — BULUK (K), JANUSZKO (J)
Patol. Pol. 1957, **8**, 107
- 25 — CAPET — ANTONINI (F)
Nouv. rev. Fr. d'Hémat, 1963, **3**, 585
- 26 — CASPARY (E.A.) et KEKWICK (R.A.)
Biochim. J. 1957, **67**, 41
- 27 — CHARGAFF (E) et BENDICH (A)
J. Biol. Chem. 1943, **149**, 93
- 28 — CHRISTENSEN (L.R.)
J. Gen. Physiol. 1945, **28**, 363
- 29 — CHRISTENSEN (L.R.) et MAC LEOD (C.M.)
J. Gen. Physiol. 1945, **28**, 559
- 30 — CHRISTENSEN (L.R.)
J. Gen. Physiol. 1946, **30**, 149
- 31 — CHRISTENSEN (L.R.) in «Streptococcal infections»
Columbia Univ. Press. New York 1954
- 32 — COPLEY (L) Geloplastic and antigeloplastic
agents affeting the third phase of blood Coagulation
— Rés. Communic. 2è congrès international de
biochimie, Paris 21-27 Juillet 1952
- 33 — DAVIES (M) et ENGLERT (M)
J. Biol. Chem. 1960, **235**, 1011
- 34 — de ROBERTIES (E)
Blood 1955, **10**, 528
- 35 — DESTAING (F), DUZER (A), FERRAND (B) et
PORTIER (A)
Path. Biol. 1960, **8**, 1615

- 36 — DOLESCHER (W) AUERSWALD (W)
Thromb. Diath. Hoem. 1961, **6**, 45
- 37 — FERGUSON (J.H.) Blood coagulation, Thrombosis and
hemorrhagic disorders in «Annual review of physiology»
vol VIII, 1946, page 231
- 38 — FLETCHER (A.P.)
Biochem. J. 1954, 56, **4**, 677
- 39 — FLETCHER (A.P.), SHERRY (S)
J. Biol. Chem. 1959, **234**, 832
- 40 — GUEST (H.M.), CELANDER (D.R.)
Texas. Ref. Biol. Med. 1961, **19**, **1**, 85
- 41 — GIACOMAZZI (G)
Le sang 1958, **29**, 614
- 42 — HALSE (T)
Arch. int. pharmacodyn. 1951, **86**, 168
- 43 — HOLEMANS (R), ADAMIS (D), HORACE (J.F.)
Experientia, 1962, **18**, 377
- 44 — JACOBSSON (K)
Scand. J. Clin. Lab. et Invest. 1955, 7, Suppl. 14
- 45 — KAPLAN (M.H.)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1944, **57**, 40
- 46 — KAPLAN (M.H.)
J. Clin. Invest. 1946, **25**, 331
- 47 — KEKWICK (R.A.) MACKAY (M.E.) NAUCE (M.H.)
et RECORD (B.R.)
Biochem. J. 1955, **60**, 671

- 48 — KJELGAARD (N.O.) et PLOUG (J)
Biochim. Biophys. Acta 1957, **24**, 283
- 49 — KLINE (D.L.) et FISHMANN (J.B.)
J. Biol. Chem. 1961, **236**, 2807
- 50 — KONTTINEN (Y)
Scand. J. Clin. lab. Invest. 1962, **14**, 1
- 51 — KOWALSKI (E), NIEWIAROVSKI (S)
Le sang 1956, **27**, 466
- 52 — KOWAR ZYK (H)
Lancet 1960, **1**, 7116, 176
- 53 — KUNITZ (M), NORTHORP (J.H.)
J. Gen. physiol. 1936 — **19**, 991
- 54 — KUNITZ (M)
J. Gen. physiol. 1947, 30, **4**, 291
- 55 — LACK (C.H.)
Nature 1948, **161**, 559
- 56 — LAKI (K)
Physikal. Chem. 1942, **95**, 273
- 57 — LAKI (K)
Feder. Proc. 1953, **12**, 471
- 58 — LAKI (K). MOMMAERTZ (W.F.H.M.)
Nature 1945, **156**, 664
- 59 — LAKI (K)
The transition of fibrinogen to fibrin in Blood
Clotting and allied problems
(Josiah Macy Jr Foundation, édit. New York)
1951, **4**, 217

- 60 — LAKI (K), LORAND (L)
Science 1948, **168**, 280
- 61 — LARUELLE (P)
Le sang 1950, **21**, 812
- 62 — LASSEN (M)
Biochem. J. 1958, **69**, 360
- 63 — LECLERC (M) et KHODABANDEH (A)
Ann. biol. clin. 1953, **11**, 596
- 64 — LEROUX (M)
Ann. Biol. clin. 1953, **11**, 7 — 9, 458
- 65 — LEROUX (M), PRUGNAUD (R) et FRIGOT (P)
Ann. Biol. Clin. 1952, **10**, 142
- 66 — LE POLLES (Ch. Y) et FROCRAIN (F)
Fiches APDILA le pharmacien biologiste
1959, Juin N° 13
- 67 — LIAN (C), SASSIER (R), JACQUET (J) et
FRUMESAN (P)
Bull. et Mem. Soc. Med. Hop. Paris 1936, **21**, 598
- 68 — LOEWY (A.G) EDSALL (J.T.)
J. Biol. Chem. 1954, **211**, 929
- 69 — LOEWY (AG), DUNATHAN (K), KRIEL (R) et
WOLFINGER Jr (H.L.)
J. Biol. Chem. 1961, **236**, 2625
- 70 — LOOMIS (F.C.)
Fibrinolysin and antifibrinolysin :
A Proteolytic enzyme system in blood in «Blood
clotting and allied problems (Publication Josiah Macy
Jr. Foundation New York) 1952, **5**, 280

- 71 — LORAND (L)
Biochem. J. 1952, **52**, 260
- 72 — LYOONS (RN)
Austral. Journ. Exp. Biol. 1945, **23**, 131
- 73 — MAC FARLANE (R.G.) et BIGGS (R)
Blood 1948, **3**, 1167
- 74 — MANET (L), MOURAD (M)
Ann. Biol. Clin. 1963, **21**, 405
- 75 — MARENZI (A.D.) et GOMEZ (C.J.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, **33**, 409
- 76 — MELLANBY (J)
Proc. Roy. Soc. (London) 1933, **93**, 113
- 76 bis — MESTER (L), MOCZAR (E), MEDGYESI (C)
et LAKI (E)
C.R. Acad. Sciences 1963, **256**, 307
- 76 ter — MESTER (L) MOCZAR (E) et LAKI (K)
C.R. Acad. Sciences 1963, **256**, 3210
- 77 — MIDDLEBROOK (W.R.)
Biochem. J. 1955, **59**, 146
- 78 — MILSTONE (H)
J. Immunol. 1941 **42**, 109
- 79 — MOMMAERTS (W.F.)
J. Gen. Physiol. 1945, **29**, 103

- 80 — MOUNTER (L.A.) et SHIPLEY (B.A.)
J. Biol. Chem. 1958, **231**, 855
- 81 — MULLERTZ (S)
Biochem. J. 1955, **61**, 424
- 82 — MULLERTZ (S) et LASSEN (M)
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1953, **82**, 264
- 83 — NEURATH (M) et SCHWERT (G.W.)
Chem. Rev. 1950, **461**, 69
- 84 — NIEWIAROVSKI (S) KOWALSKI (E) et KOPEC (M)
J. Clin. Path. 1959, **12**, 215
- 85 — NIEWIAROVSKI (S)
Path. Biol. 1959, **7**, 23-24
- 86 — NORMAN (P.S.) et HILL (B.M.)
J. Exptl. Med. 1958, **108**, 639
- 87 — NORMAN (P.S.)
J. Exptl. Med. 1957, **106**, 423
- 88 — OWREN (P.A.)
Acta. Med. Scand. 1947 Suppl. 194, 327
- 89 — PETERS (S) et VAN SLYKE (D)
Quantitative clinical chemistry 1942 (ed. Williams et Wilkins) Baltimore page 696 — 697
- 90 — POLONOWSKI (M)
Biochimie médicale Masson 1959 — 6è édition
page 200
- 91 — REMMERT (L.F.) et COHEN (P.P.)
J. Biol. Chem. 1949, **181**, 431

- 91 bis — ROBERTS (P.S.)
J. Biol. Chem. 1958, **232**, 285
- 92 — RONWIN (D)
Canad. J. Biochem. and Physiol. 1956, **34**, 1169
- 93 — SAMAMA (M) et MANET (L)
Techniques d'exploration de l'hémostase et de la
coagulation 1963 (ed. Gilanne Paris)
- 94 — SCHWERT (W) et TAKENAKA (M)
Biochim. Biophys. Acta 1955, 16, 570
- 95 — SEEGER (W.H.) et LOOMIS (F.C.)
Science 1946, **104**, 461
- 96 — SHERRY (S) et TROLL (W)
J. Biol. Chem. 1954, **95**, 208
- 97 — SHERRY (S) FLETCHER (A.P.) et ALKJAERSIG (N)
Physiol. revs. **1959**, 39, 343
- 98 — SHULMAN (S), ALKJAERSIG (N) et SHERRY (S)
J. Biol. Chem. 1958, **233**, 91
- 99 — SOVINSKY (R), OHARENKO (L) KOENIG (V.L.)
J. Amer. Chem. Soc. 1959, **81**, 6193
- 100 — TILLET (W.S.) et GARNER (R.L.)
J. Exptl. Med. 1935, **58**, 485
- 101 — TILLET (W.S.), GARNER (A.L.)
J. Exptl. Med. 1934, **60**, 239
- 102 — TILLET (W.S.), EDWARDS (L.B.) et GARNER (R.L.)
J. Clin. Invest. 1934, **13**, 47
- 103 — TRAISNEL (J) et DOUMER
Fiches APDILA Le Pharmacien biologiste 1960 Juin
N° 17

- 104 — TRISTRAM (G.B.)
The Amino-Acid. composition of proteins, in NEU-
RATH (H et BAILEY — «The Proteins»
(Academic Press Edit. New-York 1953)
- 105 — TROLL (W). SHERRY (S) et WACHMAN (J)
J. Biol. Chem. 1954, **205**, 85
- 106 — VINCENT (D), SEGONZAG (G) et LACROIX (R)
Ann. Biol. Clin 1962, **20**, 673 et Presse méd. 1962,
70, 53, 2580
- 107 — VON CLAUSS (A)
Acta Hoemat. (Basel) 1957, **17**, 237
- 108 — VON KAULLA (K)
Amer. J. Clin. Path. 1958, **29**, 104
- 109 — VON KAULLA (K)
Klin, Wachr, 1957, **35**, 667
- 110 — VON KAULLA (K), MC DONALD (TS)
Blood 1958, **13**, 811
- 111 — WEISS (M)
Rev. franç. étud. clin. biol. 1959, **4**, 726
- 112 — WINZLER (R)
The Glycoproteins in the plasma proteins de Frank-W-
PUTNAM, Volume I, 1960, Chap. 9, page 318.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
INTRODUCTION	17
F I B R I N O G E N E	
BIBLIOGRAPHIE	
— Origine et localisation	19
— Propriétés physico-chimiques	19
— Constitution	21
— Conversion fibrinogène-fibrine	23
● nature	24
● cinétique	28
— Détermination du fibrinogène plasmatique	28
● choix de l'anticoagulant	30
● techniques utilisées	31
MISES AU POINT	
● Mise en évidence des perturbations dues à l'héparine	33
● Etude de l'influence des anti-héparines sur les dosages de fibrinogène	35
Discussion {	
I — Sulfate de protamine	40
II Polybrène ...	40
III — Bleu de toluidine ...	40
● Etude la neutralisation de l'héparine par les antihéparines	41

● Etude des déterminations du fibrinogène sur plasma hépariné en présence d'antihéparine	42
Discussion {	
I — sulfate de protamine	43
II — polybrène	44
III — bleu de toluidine ...	44
— CONCLUSIONS GENERALES	48
● Techniques proposées :	
I — technique par pesée	49
II — microtechnique biuret ...	53
III — technique chronométrique	56

FIBRINOLYSE

BIBLIOGRAPHIE

— Historique	61
— Propriétés physico-chimiques des facteurs de la fibrinolyse	62
● Plasminogène {	
a) propriétés physiques	62
b) propriétés chimiques	62
● Plasmine {	
a) propriétés physiques	62
b) propriétés chimiques	63

—	ACTIVITEURS DU PLASMINOGENE	63																
	<table> <tr> <td rowspan="2">{</td> <td>a) Streptokinase</td> <td>63</td> </tr> <tr> <td>b) Staphylokinase</td> <td>64</td> </tr> </table>	{	a) Streptokinase	63	b) Staphylokinase	64												
{	a) Streptokinase		63															
	b) Staphylokinase	64																
	● Activateurs d'origine bactérienne ...	63																
	<table> <tr> <td rowspan="4">{</td> <td>a) fibrinokinase</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>b) plasmine</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>c) urokinase</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>d) trypsine</td> <td>65</td> </tr> </table>	{	a) fibrinokinase	65	b) plasmine	65	c) urokinase	65	d) trypsine	65								
{	a) fibrinokinase		65															
	b) plasmine		65															
	c) urokinase		65															
	d) trypsine	65																
—	INHIBITEURS	66																
	● Inhibiteurs de la transformation du plasminogène en plasmine	66																
	<table> <tr> <td rowspan="3">{</td> <td>a) acide epsilon aminocaproïque</td> <td>66</td> </tr> <tr> <td>b) diisopropylfluorophosphate</td> <td>66</td> </tr> <tr> <td>c) anticorps { antistreptococi-</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>que</td> <td>66</td> </tr> <tr> <td></td> <td>antistaphylo-</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>coccique</td> <td>66</td> </tr> </table>	{	a) acide epsilon aminocaproïque	66	b) diisopropylfluorophosphate	66	c) anticorps { antistreptococi-			que	66		antistaphylo-			coccique	66	
{	a) acide epsilon aminocaproïque		66															
	b) diisopropylfluorophosphate		66															
	c) anticorps { antistreptococi-																	
	que	66																
	antistaphylo-																	
	coccique	66																
	● Inhibiteurs de la plasmine	66																
	<table> <tr> <td rowspan="4">{</td> <td>a) Inhibition physiologique</td> <td>66</td> </tr> <tr> <td>b) Soja</td> <td>66</td> </tr> <tr> <td>c) Organophosphates, métaux</td> <td></td> </tr> <tr> <td>lourds</td> <td>67</td> </tr> <tr> <td></td> <td>d) Inhibiteur de Kunitz</td> <td>67</td> </tr> </table>	{	a) Inhibition physiologique	66	b) Soja	66	c) Organophosphates, métaux		lourds	67		d) Inhibiteur de Kunitz	67					
{	a) Inhibition physiologique		66															
	b) Soja		66															
	c) Organophosphates, métaux																	
	lourds	67																
	d) Inhibiteur de Kunitz	67																

	PAGE
— Système enzymatique de la fibrinolyse	67
— Substrats protéïques et synthétiques de la plasmine ...	68
— Etude analytique du système fibrinolytique	69
● Dosage du plasminogène	69
{ a) technique de NIEWIA-ROVSKI	69
{ b) technique de SCHWERT TAKENAKA	69
{ c) technique caséïnolytique ...	70
● Dosage de la plasmine libre	70
● Dosage des effecteurs	70

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE DU DOSAGE DU PLASMINOGENE

— Technique choisie	71
— Etablissement de la courbe d'étalonnage	72
1°) — solution pure	72
2°) — milieu complexe	72
{ a) stabilité de la tyrosine dans le filtrat	74
{ b) stabilité de la tyrosine en cours d'incubation	74
{ c) importance de la centrifugation ou de la filtration	75
{ d) étude de la courbe d'étalonnage avec des filtres lavés	77

	PAGE
— Technique de dosage du plasminogène plasmatique	
par caséïnyse	78
— Etude des différents temps du dosage	87
I) précipitation des euglobulines	87
a) mode de précipitation	87
b) détermination du pH optimal de précipitation des euglobulines	90
1° — Von KAULLA	90
2° — NIEMIAROVSKI	103
3° — Mûrissement	110
4° — Conclusions	113
II) Reproductibilité de la technique caséïnytique	115
III) Comparaison de l'activité caséïnytique des euglobulines obtenues par les deux modes d'acidification (CO₂ ou acide acétique) ...	117
IV) Influence de l'anticoagulant utilisé sur l'activité caséïnytique du précipité d'euglobulines	121
V) Etude de la conservation et de la congélation	124
— CONCLUSIONS GENERALES	127

● TECHNIQUE PROPOSEE	128
----------------------------	-----

APPRECIATION SEMI QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE

— Technique des plateaux de fibrine d'après :

ASTRUP, MULLERTZ, LASSEN	135
--------------------------------	-----

I — Principe	135
--------------------	-----

II — Etude critique des réactifs et du matériel	135
--	-----

● chauffage des plateaux	138
--------------------------------	-----

● sensibilité des plateaux chauffés	140
-------------------------------------	-----

● conservation des plateaux ...	140
---------------------------------	-----

III — Technique	142
-----------------------	-----

● Discussion	142
--------------------	-----

● Résultats	144
-------------------	-----

IV — Reproductibilité de la technique des plateaux	146
---	-----

V — Etude de l'activité fibrinolytique de la streptokinase sur les plateaux chauffés et non chauffés	149
--	-----

VI — Signification de la méthode des plateaux	152
--	-----

A/ activation du plasma humain par la streptokinase	152
--	-----

B/ Variations de l'activité fibrinolytique en fonction de l'apport plasmatique	157
---	-----

	PAGE
{ a) sur plateaux non chauffés	157
{ b) sur plateaux chauffés	158
C/ Variations de l'activité fibrinolytique sur plateaux chauffés et non chauffés en fonction de l'apport de solution des euglobulines, comparaison avec le plasma	160
VII — Influence de l'anticoagulant sur l'esti- mation d'une activité fibrinolytique plasmatique par la technique des pla- teaux	166
— C O N C L U S I O N S	170
— A P P L I C A T I O N S C L I N I Q U E S	171
— R E S U M E	180
— B I B L I O G R A P H I E	183

